



Etude du comportement des enzymes immobilisées par capteurs enzymatiques. Activités catalytiques et phénomènes d'inhibition, analyse mathématique et applications analytiques

Jacques Beaux

► To cite this version:

Jacques Beaux. Etude du comportement des enzymes immobilisées par capteurs enzymatiques. Activités catalytiques et phénomènes d'inhibition, analyse mathématique et applications analytiques. Sciences de l'ingénieur [physics]. Institut National Polytechnique de Grenoble - INPG, 1983. Français. NNT: . tel-01066004

HAL Id: tel-01066004

<https://theses.hal.science/tel-01066004>

Submitted on 19 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE
SCIENTIFIQUE ET MEDICALE

L'INSTITUT
NATIONAL POLYTECHNIQUE

DE GRENOBLE

pour obtenir

Le Grade De DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jacques BEAUX

Ingénieur Civil des Mines

ETUDE DU COMPORTEMENT DES ENZYMES
IMMOBILISEES PAR CAPTEURS ENZYMATIQUES

ACTIVITES CATALYTIQUES ET PHENOMENES
D'INHIBITION

ANALYSE MATHEMATIQUE ET APPLICATIONS
ANALYTIQUES

Soutenue le 15 Novembre 1983 devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur

B. TREMILLON

Président

Messieurs

M. COMTAT
F. PUJOL
M. RENAUD
J.D.R. THOMAS
C. TRAN-MINH

Examineurs

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE
SCIENTIFIQUE ET MEDICALE

L'INSTITUT
NATIONAL POLYTECHNIQUE

DE GRENOBLE

pour obtenir

Le Grade De DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jacques BEAUX

Ingénieur Civil des Mines

**ETUDE DU COMPORTEMENT DES ENZYMES
IMMOBILISEES PAR CAPTEURS ENZYMATIQUES**

**ACTIVITES CATALYTIQUES ET PHENOMENES
D'INHIBITION**

**ANALYSE MATHEMATIQUE ET APPLICATIONS
ANALYTIQUES**

Soutenue le 15 Novembre 1983 devant la Commission d'Examen

JURY

Monsieur

B. TREMILLON

Président

Messieurs

M. COMTAT
F. PUJOL
M. RENAUD
J.D.R. THOMAS
C. TRAN-MINH

Examineurs

Président de l'Université : M. TANCHE

MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT DE L'U.S.M.G.

(RANG A)

SAUF ENSEIGNANTS EN MEDECINE ET PHARMACIE

PROFESSEURS DE 1ère CLASSE :

ARNAUD Paul	Chimie organique
ARVIEU Robert	Physique nucléaire I.S.N.
AUBERT Guy	Physique C.N.R.S.
AYANT Yves	Physique approfondie
BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale C.N.R.S. (labo. de magnétisme)
BARJON Robert	Physique nucléaire I.S.N.
BARNOLD-Fernand	Biosynthèse de la cellulose-Biologie
BARRA Jean-René	Statistiques - Maths appliquées
BELORISKY Elie	Physique
BENZAKEN Claude (Mr)	Mathématiques pures
BERNARD Alain	Mathématiques pures
BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques pures
BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques pures
BILLET Jean	Géographie
BONNIER Jean-Marie	Chimie générale
BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire I.S.N.
BRAVARD Yves	Géographie
CARLIER Georges	Biologie végétale
CAUQUIS Georges	Chimie organique
CHIBON Pierre	Biologie animale
COLIN DE VERDIERE Yves	Mathématiques pures
CRABBE Pierre (détaché)	C.E.R.M.O.
CYROT Michel	Physique du solide
DAUMAS Max	Géographie
DEBELMAS Jacques	Géologie générale
DEGRANGE Charles	Zoologie
DELOBEL Claude (Mr)	M.I.A.G. Mathématiques appliquées
DEPORTES Charles	Chimie minérale
DESRE Pierre	Electrochimie
DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
DUCROS Pierre	Cristallographie
FONTAINE Jean-Marc	Mathématiques pures
GAGNAIRE Didier	Chimie physique
GASTINEL Noël	Analyse numérique Mathématiques appliquées

GERBER Robert
 GERMAIN Jean-Pierre
 GIRAUD Pierre
 IDELMAN Simon
 JANIN Bernard
 JOLY Jean-René
 JULLIEN Pierre
 KAHANE André (détaché DAFCO)
 KAHANE Josette
 KOSZUL Jean-Louis
 KRAKOWIAK Sacha
 KUPTA Yvon
 LACAZE Albert
 LAJZEROWICZ Jeannine
 LAJZEROWICZ Joseph
 LAURENT Pierre
 DE LEIRIS Joël
 LLIBOUTRY Louis
 LOISEAUX Jean-Marie
 LOUP Jean
 MACHE Régis
 MAYNARD Roger
 MICHEL Robert
 NOZIERES Philippe
 OMONT Alain
 OZENDA Paul
 PAVAN Jean-Jacques (détaché)
 PEBAY PEYROULA Jean-Claude
 PERRIAUX Jacques
 PERRIER Guy
 PIERRARD Jean-Marie
 RASSAT André
 RENARD Michel
 RICHARD Lucien
 RINAUDO Marguerite
 SENDEL Philippe
 SERGERAERT Francis
 SOUTIF Michel
 VAILLANT François
 VALENTIN Jacques
 VAN CUTSEN Bernard
 VAUQUOIS Bernard
 VIALON Pierre

Mathématiques pures
 Mécanique
 Géologie
 Physiologie animale
 Géographie
 Mathématiques pures
 Mathématiques appliquées
 Physique
 Physique
 Mathématiques pures
 Mathématiques appliquées
 Mathématiques pures
 Thermodynamique
 Physique
 Physique
 Mathématiques appliquées
 Biologie
 Géophysique
 Sciences nucléaires I.S.N.
 Géographie
 Physiologie végétale
 Physique du solide
 Minéralogie et pétrographie (géologie)
 Spectrométrie - Physique
 Astrophysique
 Botanique (biologie végétale)
 Mathématiques pures
 Physique
 Géologie
 Géophysique
 Mécanique
 Chimie systématique
 Thermodynamique
 Biologie végétale
 Chimie CERMAV
 Biologie animale
 Mathématiques pures
 Physique
 Zoologie
 Physique nucléaire I.S.N.
 Mathématiques appliquées
 Mathématiques appliquées
 Géologie

PROFESSEURS DE 2^{ème} CLASSE :

ADIBA Michel
 ARMAND Gilbert
 AURIAULT Jean-Louis
 BEGUIN Claude (Mr)
 BOEHLER Jean-Paul
 BOITET Christian
 BORNAREL Jean
 BRUN Gilbert
 CASTAING Bernard
 CHARDON Michel
 COHENADDAD Jean-Pierre
 DENEUVILLE Alain

Mathématiques pures
 Géographie
 Mécanique
 Chimie organique
 Mécanique
 Mathématiques appliquées
 Physique
 Biologie
 Physique
 Géographie
 Physique
 Physique

DEPASSEL Roger
DOUCE Roland
DUFRESNOY Alain
GASPARD François
GAUTRON René
GIDON Maurice
GIGNOUX Claude (Mr)
GUITTON Jacques
HACQUES Gérard
HERBIN Jacky
HICTER Pierre
JOSELEAU Jean-Paul
KERCKOVE Claude (Mr)
LE BRETON Alain
LONGEQUEUE Nicole
LUCAS Robert
LUNA Domingo
MASCLE Georges
NEMOZ Alain
OUDET Bruno
PELMONT Jean
PERRIN Claude (mr)
PFISTER Jean-Claude (détaché)
PIBOULE Michel
PIERRE Jean-Louis
RAYNAUD Hervé
ROBERT Gilles
ROBERT Jean-Bernard
ROSSI André
SAKAROVITCH Michel
SARROT REYNAUD Jean
SAXOD Raymond
SOUTIF Jeanne
SCHOOL Pierre-Claude
STUTZ Pierre
SUBRA Robert
VIDAL Michel
VIVIAN Robert

Mécanique des fluides
Physiologie végétale
Mathématiques pures
Physique
Chimie
Géologie
Sciences nucléaires I.S.N.
Chimie
Mathématiques appliquées
Géographie
Chimie
Biochimie
Géologie
Mathématiques appliquées
sciences nucléaires I.S.N.
Physiques
Mathématiques pures
Géologie
Thermodynamique (CNRS - CRTBT)
Mathématiques appliquées
Biochimie
Sciences nucléaires I.S.N.
Physique du solide
Géologie
Chimie organique
Mathématiques appliquées
Mathématiques pures
Chimie physique
Physiologie végétale
Mathématiques appliquées
Géologie
Biologie animale
Physique
Mathématiques appliquées
Mécanique
Chimie
Chimie organique
Géographie

Président : Daniel BLOCH

Vice-Présidents : René CARRE
Hervé CHERADAME
Marcel IVANES

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ANCEAU François	E.N.S.I.M.A.G
BARRAUD Alain	E.N.S.I.E.G
BAUDELET Bernard	E.N.S.I.E.G
BESSON Jean	E.N.S.E.E.G
BLIMAN Samuel	E.N.S.E.R.G
BLOCH Daniel	E.N.S.I.E.G
BOIS Philippe	E.N.S.H.G
BONNETAIN Lucien	E.N.S.E.E.G
BONNIER Etienne	E.N.S.E.E.G
BOUVARD Maurice	E.N.S.H.G
BRISSONNEAU Pierre	E.N.S.I.E.G
BUYLE-BODIN Maurice	E.N.S.E.R.G
CAVAIGNAC Jean-François	E.N.S.I.E.G
CHARTIER Germain	E.N.S.I.E.G
CHENEVIER Pierre	E.N.S.E.R.G
CHERADAME Hervé	M.C.P.P
CHERUY Arlette	E.N.S.I.E.G
CHIAVERINA Jean	M.C.P.P
COHEN Joseph	E.N.S.E.R.G
COUMES André	E.N.S.E.R.G
DURAND Francis	E.N.S.E.E.G
DURAND Jean-Louis	E.N.S.I.E.G
FELICI Noël	E.N.S.I.E.G
FOULARD Claude	E.N.S.I.E.G
GENTIL Pierre	E.N.S.E.R.G
GUERIN Bernard	E.N.S.E.R.G
GUYOT Pierre	E.N.S.E.E.G
IVANES Marcel	E.N.S.I.E.G
JAUSSAUD Pierre	E.N.S.I.E.G
JOUBERT Jean-Claude	E.N.S.I.E.G
JOURDAIN Geneviève	E.N.S.I.E.G
LACOURME Jean-Louis	E.N.S.I.E.G
LATOMBE Jean-Claude	E.N.S.I.M.A.G
LESIEUR Marcel	E.N.S.H.G
LESPINARD Georges	E.N.S.H.G
LONGQUEUE Jean-Pierre	E.N.S.I.E.G
MAZARE Guy	E.N.S.I.M.A.G
MOREAU René	E.N.S.H.G
MORET Roger	E.N.S.I.E.G
MOSSIERE Jacques	E.N.S.I.M.A.G
PARIAUD Jean-Charles	E.N.S.E.E.G

PAUTHENET René	E.N.S.I.E.G
PERRET René	E.N.S.I.E.G
PERRET Robert	E.N.S.I.E.G
PIAU Jean-Michel	E.N.S.H.G
POLOUJADOFF Michel	E.N.S.I.E.G
POUPOT Christian	E.N.S.E.R.G
RAMEAU Jean-Jacques	E.N.S.E.E.G
RENAUD Maurice	M.C.P.P
ROBERT André	M.C.P.P
ROBERT Francois	E.N.S.I.M.A.G
SABONNADIÈRE Jean-Claude	E.N.S.I.E.G
SAUCIER Gabrielle	E.N.S.I.M.A.G
SCHLENKER Claire	E.N.S.I.E.G
SCHLENKER Michel	E.N.S.I.E.G
SERMET Pierre	E.N.S.E.R.G
SOUQUET Jean-Louis	E.N.S.E.E.G
SILVY Jacques	M.C.P.P
SOHM Jean-Claude	E.N.S.E.E.G
VEILLON Gérard	E.N.S.I.M.A.G
ZADWORYN François	E.N.S.E.R.G

PROFESSEURS ASSOCIES

ANTONIA Robert	E.N.S.H.G
BASTIN Georges	E.N.S.H.G
CARREAU Pierre	E.N.S.H.G
GANDINI Alessandro	M.C.P.P
HAYASHI Hirashi	E.N.S.I.E.G
NOWACKI Krzysztof	E.N.S.H.G
PAPATRIANTAFILLOU Costas	E.N.S.E.R.G
SILVESTER Peter	E.N.S.I.E.G

PROFESSEURS E.N.S MINES DE SAINT ETIENNE

RIEU Jean
SOUSTELLE Michel

CHERCHEURS DU C.N.R.S

FRUCHART Robert	Directeur de recherche
VACHAUD Georges	Directeur de recherche
ALLIBERT Colette	Maître de recherche
ALLIBERT Michel	Maître de recherche
ANSARA Ibrahim	Maître de recherche
ARMAND Michel	Maître de recherche
BINDER Gilbert	
CARRE René	Maître de recherche

CHERCHEURS DU C.N.R.S (Suite)

DAVID René	Maître de recherche
DEPORTES Jacques	
DRIOLE Jean	Maître de recherche
GIGNOUX Damien	
GIVORD Dominique	
GUELIN Pierre	
HOPFINGER Emil	Maître de recherche
KAMARINOS Georges	Maître de recherche
KLEITZ Michel	Maître de recherche
LANDAU Ioan-Dore	Maître de recherche
LASJAUNIAS J.C	Maître de recherche
MERMET Jean	
MUNIER Jacques	Maître de recherche
PIAU Monique	Maître de recherche
PORTESEIL Jean-Louis	
THOLENCE Jean-Louis	
VERDILLON André	Maître de recherche

CHERCHEURS DU MINISTERE DE LA RECHERCHE ET DE LA TECHNOLOGIE

(Directeurs et Maîtres de recherche - E.N.S Mines de St Etienne)

LESBATS Pierre	Directeur de recherche
BISCONDI Michel	Maître de recherche
KOBYLANSKI André	Maître de recherche
LE COZE Jean	Maître de recherche
LALAUZE René	Maître de recherche
LANCELOT Francis	Maître de recherche
THEVENOT François	Maître de recherche
TRAN MINH Canh	Maître de recherche

PERSONNALITES HABILITEES A DIRIGER DES TRAVAUX DE RECHERCHE

(Décision du Conseil Scientifique)

E.N.S.E.E.G

BERNARD Claude	JOURD Jean-Charles
BONNET Roland	MALMEJAC Yves (CENG)
CAILLET Marcel	MARTIN-GARIN Régina
CHATILLON Catherine	NGUYEN TRUONG Bernadette
CHATILLON Christian	RAVAINE Denis
COULON Michel	SAINFORT (CENG)
DIARD Jean-Paul	SARRAZIN Pierre
EUSTATHOPOULOS Nicolas	SIMON Jean-Paul
FOSTER Panayotis	TOUZAIN Philippe
GALERIE Alain	URBAIN Georges (Laboratoire des ultra- réfractaires, ODEILLO)
HAMMOU Abdelkader	

PERSONNALITES HABILITEES A DIRIGER DES TRAVAUX DE RECHERCHE (Suite)

(Décision du Conseil Scientifique)

E.N.S.M Saint Etienne

GUILHOT Bernard
THOMAS Gérard
DRIVER Julian

E.N.S.E.R.G

BARIBAUD Michel
BOREL Joseph
CHOVET Alain
CHEHIKIAN Alain
DOLMAZON Jean-Marc
HERAULT Jeanny
MONLLOR Christian

E.N.S.I.E.G

BORNARD Guy
DESCHIZEAUX Pierre
GLANGEAUD François
KOFMAN Walter
LEJEUNE Gérard
MAZUER Jean
PERARD Jacques
REINISCH Raymond

E.N.S.H.G

ALEMANY Antoine
BOIS Daniel
DARVE Félix
MICHEL Jean-Marie
OBLED Charles
ROWE Alain
VAUCLIN Michel
WACK Bernard

E.N.S.I.M.A.G

BERT Didier
CALMET Jacques
COURTIN Jacques
COURTOIS Bernard
DELLA DORA Jean
FONLUPT Jean
SIFAKIS Joseph

UER M.C.P.P

CHARUEL Robert

C.E.N.G

CADET Jean
COEURE Philippe (LETI)
DELHAYE Jean-Marc (STT)
DUPUY Michel (LETI)
JOUVE Hubert (LETI)
NICOLAU Yvan (LETI)
NIFENECKER Hervé
PERROUD Paul
PEUZIN Jean-Claude (LETI)
TAIEB Maurice
VINCENDON Marc

Laboratoires extérieurs : C.N.E.T

DEMOULIN Eric
DEVINE R.A.B
GERBER Roland
MERCKEL Gérard
PAULEAU Yves

INSA de LYON

GAUBERT C

Ce travail a été effectué au Laboratoire de "Biotechnologie-Enzymes" de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, sous la direction de Monsieur TRAN-MINH Canh, Maître de recherches.

Outre Monsieur TRAN-MINH, je remercie, Messieurs :

B. TREMILLON, Président du Jury, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris.

M. COMTAT, Professeur à l'Université de Toulouse.

M. RENAUD, Professeur à l'Ecole Française de Papeterie de Grenoble.

J.D.R. THOMAS, Professeur à "University of Wales" (UWIST) - Cardiff - Royaume-Uni.

J.F. PUJOL, Directeur de Recherches de Roussel-Uclaf.
qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Je remercie aussi Dr Francis CONRAD de l'Ecole des Mines pour ses conseils et sa participation amicale à la résolution des expressions mathématiques.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes amis du laboratoire, en particulier Danièle CHAVANNE pour sa collaboration cordiale et efficace à la réalisation pratique de cette thèse, et à tous ceux qui m'ont aidé à accomplir cette tâche dans les meilleures conditions.

Ce travail a été effectué grâce à l'appui financier de la DGRST (contrat 76-7-1521) et de l'INSERM (contrat CRL n° 806 013).

PLAN DE L'ETUDE

2
3
10
3
12
20
31
53
24
19
3

PLAN DE L'ETUDE

Page

Chapitre I : INTRODUCTION

Chapitre II : CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HOMOGENE ENZYMES EN SOLUTION

I) ACTIVITE ENZYMATIQUE - RAPPEL DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN

II-1

II) FACTEURS AFFECTANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

II-5

- 1) *EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT*
- 2) *EFFET DE LA CONCENTRATION EN ENZYME*
- 3) *PRESENCE D'ACTIVATEURS OU D'INHIBITEURS*
- 4) *INFLUENCE DE LA TEMPERATURE*
- 5) *EFFET DU pH*
- 6) *EFFET DE LA FORCE IONIQUE*

III) RAPPEL DES DIFFERENTES METHODES DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES EN SOLUTION

II-8

- 1) *METHODES MANOMETRIQUES*
- 2) *METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES*
- 3) *METHODES POLARIMETRIQUES*
- 4) *METHODES ELECTROCHIMIQUES*
- 5) *METHODES FLUORIMETRIQUES*
- 6) *METHODES RADIOCHIMIQUES*

Chapitre III : CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE ENZYMES IMMOBILISEES

I) INTERET DES ENZYMES IMMOBILISEES

III-1

II) PROPRIETES DES ENZYMES IMMOBILISEES

III-2

<p><u>Chapitre IV</u> : ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE DU COMPORTEMENT DES ENZYMES IMMOBILISEES</p>

I) METHODOLOGIE D'ETUDE

IV-1

1) *MODELE DE BASE*

2) *ANALOGIE DES PROFILS DE CONCENTRATION DANS UNE COUCHE ACTIVE
FIXEE SUR ELECTRODE ET DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE*

II) MATERIELS ET METHODES

IV-6

1) *REACTIFS*

a) *Enzymes*

b) *Substrats*

c) *Produits intervenant lors de la réalisation des membranes*

d) *Solution tampon*

2) *APPAREILLAGE*

3) *METHODE D'IMMOBILISATION*

a) *Methode*

b) *Principe d'immobilisation*

c) *Avantages de la méthode*

d) *Inconvénients*

e) *Durée de vie de l'enzyme*

<p><u>Chapitre V</u> : ELECTRODE ENZYMATIQUE POUR L'ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE - ASPECT THEORIQUE</p>
--

I) RAPPEL

V-1

II) <u>APPROXIMATION PAR LA CINETIQUE D'ORDRE 1</u>	V-2
1) <i>CONDITIONS DE VALIDITE</i>	
2) <i>RESOLUTION</i>	
III) <u>APPROXIMATION PAR LA CINETIQUE D'ORDRE 0</u>	V-5
1) <i>VALIDITE DE L'APPROXIMATION</i>	
2) <i>RESOLUTION</i>	
IV) <u>RESOLUTION A L'ETAT STATIONNAIRE AU MOYEN DE L'ANALYSE NUMERIQUE</u>	V-6
1) <i>MODELISATION A L'ETAT STATIONNAIRE</i>	
2) <i>DISCRETISATION DU MODELE</i>	
3) <i>APPROXIMATION DU MODELE DISCRETISE</i>	
4) <i>CONCLUSION</i>	
V) <u>PROFILS DE CONCENTRATION DU SUBSTRAT ET DU PRODUIT A L'INTERIEUR DE LA MEMBRANE</u>	V-11
VI) <u>IDENTIFICATION DES CONSTANTES V_m, K_m, e, D D'UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE</u>	V-13
1) <i>PRELIMINAIRE</i>	
2) <i>METHODE</i>	
a) <i>Utilisation de la réaction d'ordre 1</i>	
b) <i>Utilisation de la réaction d'ordre 0</i>	
c) <i>Détermination de l'épaisseur et du coefficient de diffusion</i>	

<p><u>Chapitre VI</u> : APPLICATION A LA REALISATION DE CAPTEURS POUR LE DOSAGE DE SUBSTRATS</p>
--

I) <u>PREAMBULE</u>	VI-1
II) <u>ELECTRODE A UREASE</u>	VI-1
1) <i>CONDITIONS DE BASE</i>	
2) <i>COURBE DE REPONSE</i>	
3) <i>POUVOIR DENATURANT DE L'AGENT PONTANT</i>	
4) <i>INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME ACTIVE IMMOBILISEE</i>	

- 5) DUREE DE VIE
- 6) INFLUENCE DU pH
- 7) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE
- 8) CONCLUSION

III) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE

VI-18

- 1) PRELIMINAIRE
- 2) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE UTILISANT UNE ELECTRODE A ACIDE ACETIQUE
 - a) Capteur à acide acétique
 - b) Dosage de l'acétylcholine
- 3) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE UTILISANT UNE ELECTRODE A pH
 - a) Mise au point de l'électrode
 - b) Réponse de l'électrode
 - c) Courbe de réponse de l'électrode
 - d) Durée de vie - Influence du pH et de la température
 - e) Remarque

IV) CAPTEUR POUR LE DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE

VI-28

- 1) PREAMBULE
- 2) MISE AU POINT DE L'ELECTRODE ENZYMATIQUE
- 3) COURBE DE REPONSE
- 4) DUREE DE VIE
- 5) REMARQUE

V) CONCLUSION DE L'ETUDE

VI-31

<p><u>Chapitre VII</u> : ELECTRODE ENZYMATIQUE POUR L'ETUDE DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE</p>

I) INTRODUCTION

VII-1

II) ETUDE THEORIQUE

VII-1

1) RAPPEL : DIFFERENTS TYPES D'INHIBITION DES ENZYMES

- a) Inhibiteurs compétitifs
- b) Inhibiteurs anti-compétitifs
- c) Inhibiteurs non-compétitifs
- d) Conclusion

2) ETUDE MATHEMATIQUE

- a) Préambule
- b) Inhibition compétitive
 - α) Approximation par la cinétique d'ordre 1
 - β) Approximation par la cinétique d'ordre 0
- c) Inhibition anti-compétitive
 - α) Approximation par la cinétique d'ordre 1
 - β) Approximation par la cinétique d'ordre 0
- d) Inhibition non-compétitive
 - α) Approximation par la cinétique d'ordre 1
 - β) Approximation par la cinétique d'ordre 0
- e) Conclusion de l'étude
- f) Influence de l'activité enzymatique de la membrane
 - α) Si la membrane est active
 - β) Au contraire, si la membrane est peu active
- g) Définition du pourcentage d'inhibition
- h) Etude théorique du pourcentage d'inhibition
- i) Effet de l'inhibition anti-compétitive sur l'activité apparente de la membrane
- j) Analogie de l'inhibition non-compétitive avec une soustraction de sites enzymatiques

III) ETUDES EXPERIMENTALES

VII-21

1) ETUDE DE LA REVERSIBILITE ET DE LA REGENERATION

- a) Méthode d'étude de la réversibilité
- b) Inhibiteurs réversibles immédiatement
- c) Inhibiteurs non réversibles immédiatement
- d) Inhibition de l'uréase immobilisée par les ions Ag^+ , Cu^{++} , Hg^{++} . Méthode de régénération
 - α) Fabrication de l'électrode enzymatique
 - β) Etude de l'inhibition
 - γ) Régénération d'une membrane à uréase inhibée par les ions Ag^+

- d) Régénération d'une membrane à uréase inhibée par les ions Cu^{++}
- e) Régénération d'une membrane à uréase inhibée par les ions Hg^{++}
- e) Inhibition et régénération de l'acétylcholinestérase immobilisée
- 2) MATERIELS ET METHODES
 - a) Inhibition compétitive et anti-compétitive
 - b) Inhibition non-compétitive
- 3) RESULTATS ET DISCUSSIONS
 - a) Inhibition compétitive
 - b) Inhibition anti-compétitive
 - a) Etude de la réponse de l'électrode
 - b) Courbe pourcentage d'inhibition
 - Système uréase - ions fluorures
 - c) Inhibition non-compétitive
- 4) CONCLUSION

<p><u>Chapitre VIII</u> : APPLICATIONS</p>

I) DOSAGE DES INHIBITEURS

VIII-1

- 1) CONDITIONS DE FABRICATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES
- 2) DOSAGE DES INHIBITEURS REVERSIBLES IMMEDIATEMENT
- 3) DOSAGE DES INHIBITEURS NON REVERSIBLES IMMEDIATEMENT
 - a) Inhibiteur de l'uréase
 - b) Inhibiteur de l'acétylcholinestérase
- 4) CONCLUSION

II) DOSAGE DU SUBSTRAT EN PRESENCE D'INHIBITEUR

VIII-14

- 1) FABRICATION DE LA MEMBRANE
- 2) MISE AU POINT DE LA METHODE
 - a) Utilisation de l'électrode à pCO_2
 - b) Electrode NH_4^+ Philips
- 3) CONCLUSION

III) SUIVI DE L'ACTIVITE D'UNE MEMBRANE A FORTE CONCENTRATION
EN ENZYME

VIII-19

- 1) *METHODOLOGIE D'ETUDE*
- 2) *CONCLUSIONS*

Chapitre IX : CAPTEURS ENTHALPIMETRIQUES

I) DOSAGE DES SUBSTRATS

IX-1

- 1) *ETUDE MATHEMATIQUE*
- 2) *MATERIELS ET METHODES*
- 3) *RESULTATS EXPERIMENTAUX*
- 4) *CONCLUSION DE L'ETUDE*

II) ETUDE DES PHENOMENES D'INHIBITION

IX-15

Chapitre X : CONCLUSION

CHAPITRE I



INTRODUCTION

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Tous les organismes sont le siège de processus biologiques régis et contrôlés par certaines substances protéiques, agissant comme des catalyseurs, en général, spécifiques d'une seule réaction chimique : les enzymes. Il existe donc globalement presque autant d'enzymes qu'il y a de réactions chimiques dans la cellule (plusieurs milliers). D'autre part, les réactions au sein des organismes vivants ne pouvant s'accomplir à des températures très élevées, les enzymes ont donc pour fonction, à l'échelle moléculaire, d'accélérer les réactions thermo-dynamiquement possibles, en abaissant l'énergie d'activation des molécules participantes.

Historiquement, la première expérience qui attira l'attention sur de telles substances, fut celle réalisée par REAUMUR en 1752, pour préciser la nature de la digestion chez les oiseaux, expériences reprises et complétées par Lazzaro SPALLANZANI de 1780 à 1783. En 1833, PAYEN et PERSOZ mirent en évidence le principe actif du malt, et obtinrent une poudre blanche soluble dans l'eau, ayant une activité intense (elle pouvait liquéfier 2000 fois son poids de fécule à 65°C). Cette découverte devait être le point de départ de toute une série d'études sur les "diastases".

Ainsi furent découvertes la pepsine du suc gastrique par SCHWANN en 1836, la trypsine du suc pancréatique par KHUNE en 1848, la lipase par Claude BERNARD en 1849, l'invertase par BERTHELLOT en 1860. Les travaux de PASTEUR et ceux de BUCHNER (1897) ont montré que les ferments mis en évidence durant la période précédente n'agissaient en fait que par l'intermédiaire de simples corps chimiques *solubles* extraits des êtres vivants, ou enzymes (du grec *zumê* : levure).

En 1926, SUMMER parvint à isoler une enzyme pure, l'uréase. Par la suite, de très nombreuses autres enzymes furent découvertes : la pepsine (1930), la trypsine (1931), l'enzyme jaune de WARBURG (1934), la lactico-

deshydrogenase (1940), l'hexokinase (1946)...

Initialement, les enzymes ont donc été utilisées en phase homogène, mais leurs applications restaient limitées, compte tenu de leur prix de revient. Le développement des travaux sur la fixation antigènes-anticorps a débouché tout naturellement sur le greffage des enzymes sur des supports insolubles. Cette technique permet d'utiliser de façon répétée ces protéines douées d'activité catalytique et donc d'apporter une solution naturelle au développement de la production industrielle de composés indispensables à la vie moderne.

D'autre part, l'immobilisation des enzymes permet une approche plus adaptée des phénomènes biologiques, car les enzymes agissent in-vivo, non à l'état libre, mais à l'état fixé dans les membranes des organismes intracellulaires [E. KATCHALSKI - 1969] [MOSBACH - 1976], ou dans les composés argileux et humiques du sol [A.D. MACLAREN - 1974]. Cependant le comportement cinétique de l'enzyme est modifié lorsqu'elle passe de la phase soluble à l'état immobilisé.

Il nous apparaissait donc nécessaire de re-définir des méthodes d'étude permettant de dégager les paramètres affectant les processus enzymatiques. Ces méthodes demandent, d'une part une modélisation et une étude mathématique des phénomènes, d'autre part, la mise au point d'une technique expérimentale permettant de suivre l'activité au sein du support enzymatique.

Les capteurs électrochimiques ou enthalpimétriques se révèlent être les mieux adaptés pour répondre à ces exigences, étant donné la rapidité de leur réponse et leur simplicité d'emploi.

Cependant, le développement et le comportement des organismes vivants sont aussi conditionnés par leur environnement extérieur immédiat. En particulier de nombreux composés peuvent modifier l'activité des enzymes. Ces substances sont appelées "effecteurs" et sont classées en activateurs ou inhibiteurs selon leur mode d'action sur la cinétique de la réaction enzymatique. Parmi les inhibiteurs, nous rencontrerons, d'une part, des ions métalliques parfois présents dans l'organisme à des concentrations très faibles, d'autre part, des produits industriels chimiques ou pharmaceutiques, dont en particulier les pesticides utilisés en agriculture. Il convenait donc de mener

une étude mathématique et expérimentale approfondie, pour obtenir une connaissance plus juste des phénomènes d'inhibition.

D'autre part, statistiquement, les empoisonnements graves sont souvent provoqués par des produits polluants ou pharmaceutiques à des concentrations très faibles. En conséquence, un système enzymatique peut perdre énormément de son efficacité lorsque de tels composés, même à l'état de traces, se trouvent à son contact. Aussi nous semblait-il possible de copier la nature, en utilisant les enzymes immobilisées sur support, afin de doser ces composés toxiques.

CHAPITRE II

CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HOMOGENE

ENZYMES EN SOLUTION

CHAPITRE II

CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HOMOGÈNE
ENZYMES EN SOLUTIONI) ACTIVITE ENZYMATIQUE - RAPPEL DE L'EQUATION DE MICHAELIS - MENTEN

La quantité d'enzyme mesurée en phase homogène ne peut s'exprimer en terme classique de concentration dans la mesure où une très faible quantité d'enzyme catalytiquement active est présente dans la solution. On est amené à traduire les résultats des mesures enzymatiques en unités d'activité de l'enzyme.

Dans la mesure du possible, nous définirons les unités d'enzymes suivant les recommandations de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) et de l'International Union of Biochemistry [I.U.B. - Enzyme nomenclature - 1972].

L'unité d'enzyme (U) sera définie comme étant la quantité d'enzyme qui hydrolyse la transformation de 1 μ mole de substrat par minute. La température de référence la plus couramment utilisée est 25°C. L'unité d'activité est donnée à partir des mesures de vitesse initiale afin de limiter les phénomènes de dénaturation, inhibition ou réversibilité dus aux produits de réaction.

L'équation de base a été développée par MICHAELIS - MENTEN [MICHAELIS L. 1913] selon le mécanisme :



S = substrat

E = enzyme

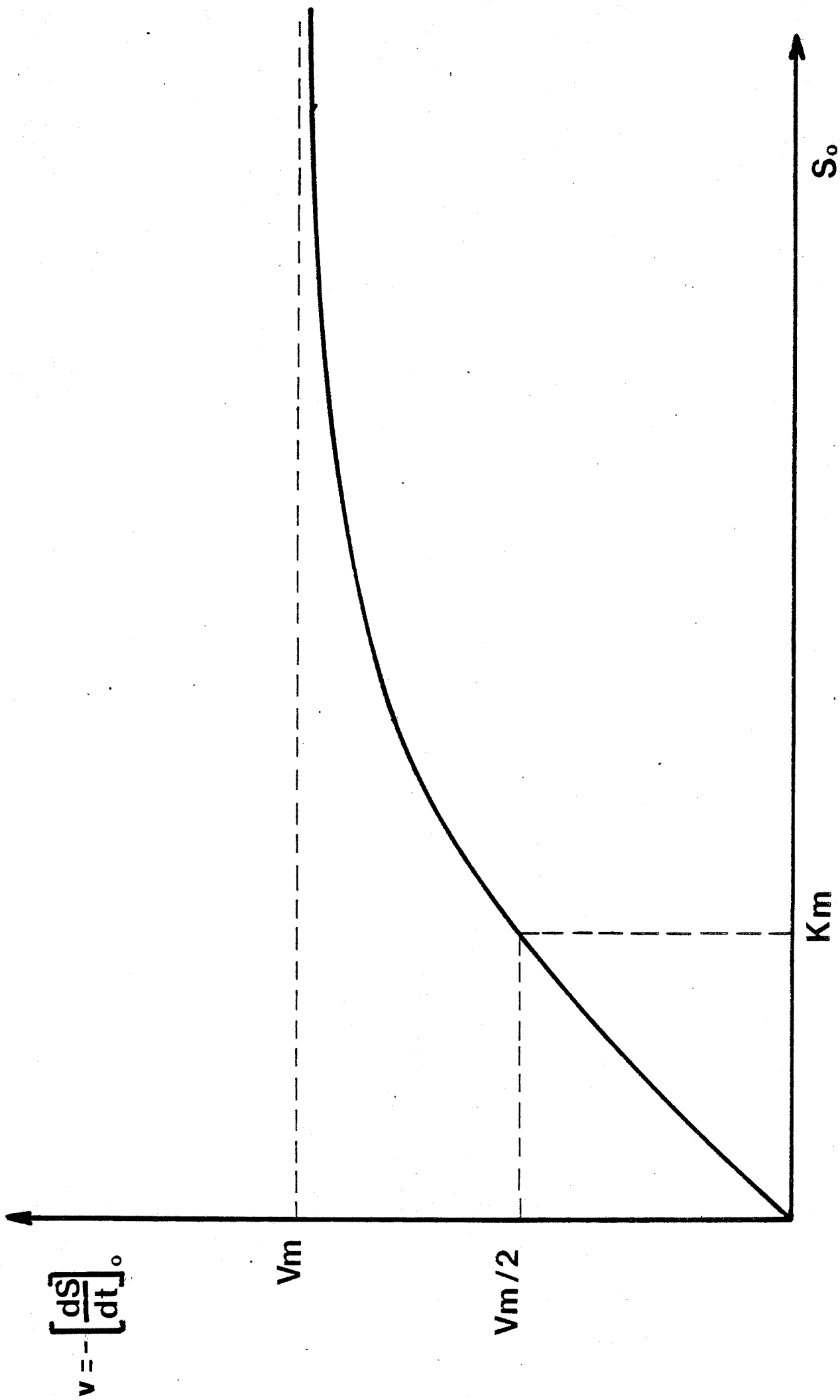


FIGURE 1 - Expression de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en phase homogène en fonction de la concentration initiale en substrat.

ES = complexe enzyme - substrat

P = produit(s) de la réaction.

A l'état stationnaire on a :

$$\frac{d[E]}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

D'autre part la conservation de la quantité globale d'enzyme impose :

$$[E] + [ES] = [E]_0$$

$[E]_0$ = concentration initiale en enzyme

$$\text{d'où} \quad v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = v_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{avec} \quad v_m = k_2 [E]_0$$

$$\text{et} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

En traçant v , vitesse initiale de la réaction en fonction de $[S]_0$ concentration initiale en substrat dans la phase aqueuse, on obtient la courbe -figure 1-.

Cette courbe permet d'atteindre les valeurs des constantes v_m et K_m ; en effet :

$$\begin{aligned} [S] \gg K_m &\implies v \rightarrow v_m \\ \text{et si } [S] = K_m &\implies v = \frac{v_m}{2} \end{aligned}$$

La transformation linéaire la plus utilisée est celle de LINEWEAVER - BURK [LINEWEAVER - 1934] où l'on trace $1/v$ en fonction de $1/[S]$.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m}$$

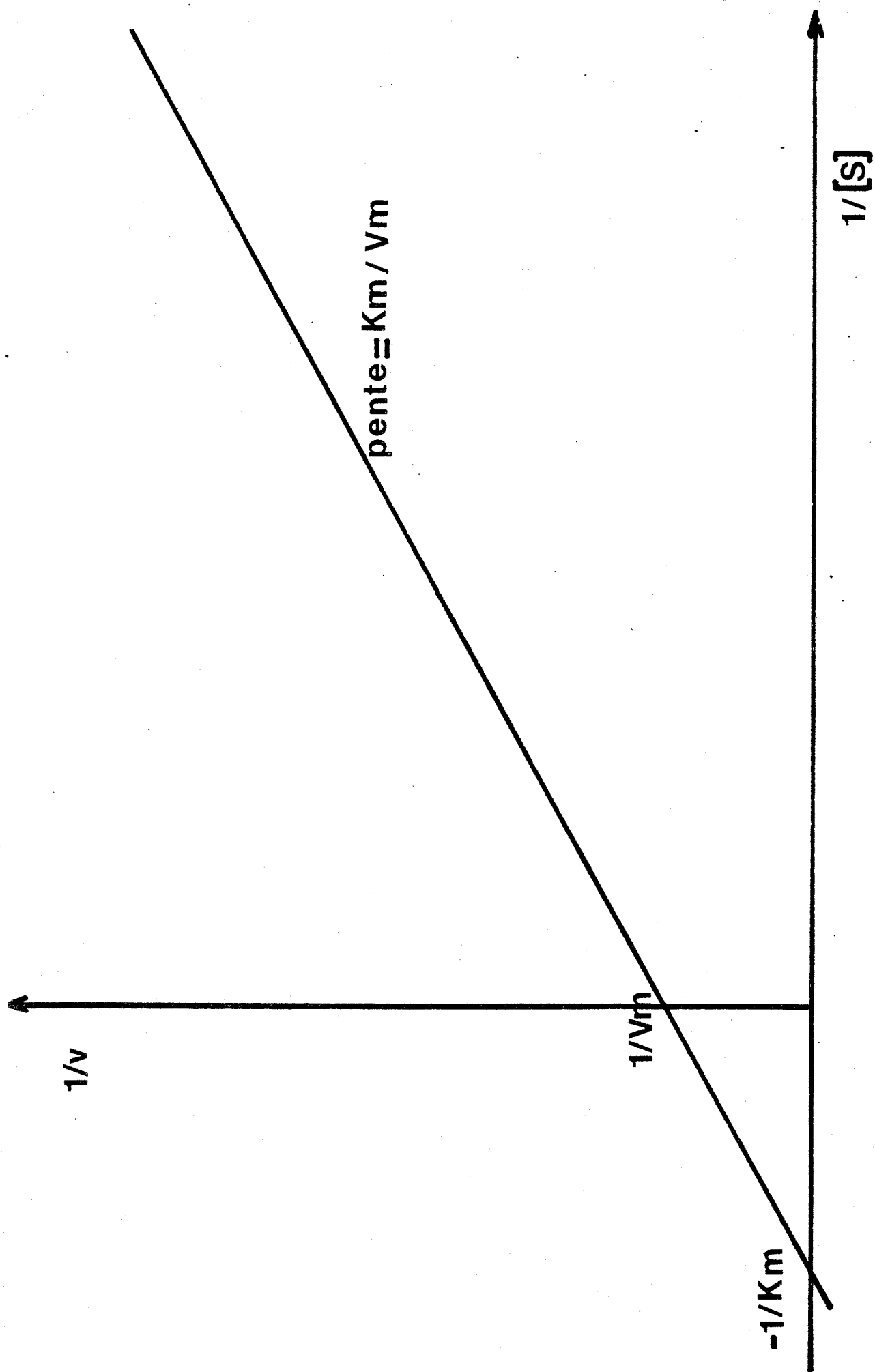


FIGURE 2 - Transformation linéaire dite de "Lineweaver-Burk" pour la détermination des paramètres V_m et K_m dans le cas d'une cinétique michaelienne en phase homogène.

La courbe est alors 1 droite de pente K_m/V_m et qui coupe l'axe des ordonnées en $Y_o = 1/V_m$ -figure 2-. Cette droite coupe l'axe des abscisses au point

$$X_o = \frac{-1}{K_m}$$

II) FACTEURS AFFECTANT LA VITESSE D'UNE REACTION ENZYMATIQUE

Les principaux facteurs pouvant modifier la vitesse d'une réaction enzymatique sont :

- la concentration en substrat
- la quantité d'enzyme
- la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs
- influence de la température
- le pH ou la force ionique

1) EFFET DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

Si $s \ll K_m$, la vitesse de la réaction devient

$$v = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \approx V_m \frac{[S]}{K_m}$$

la réaction est d'ordre 1 par rapport à s.

Si $s \gg K_m$, la vitesse s'écrit

$$v = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \approx V_m$$

la vitesse est indépendante du substrat. La réaction est d'ordre 0 par rapport à S.

Pour les autres cas, l'ordre de la réaction est mixte, et la dépendance de la vitesse en fonction de la concentration en substrat est donnée par l'équation de MICHAELIS - MENTEN.

2) EFFET DE LA CONCENTRATION EN ENZYME

$$V_m = k_{+2}[E]_0$$

Il y a donc proportionnalité entre la valeur de v_m et la concentration en enzyme, bien que certaines protéinases possèdent des cinétiques proportionnelles à $[E]^{1/2}$ ou $[E]^{3/2}$.

3) PRESENCE D'ACTIVATEURS OU D'INHIBITEURS

Certaines substances ont la propriété, soit d'augmenter l'activité catalytique : ce sont des activateurs, soit au contraire d'abaisser cette activité : ce sont des inhibiteurs.

L'influence de la concentration en activateur sur la vitesse initiale d'une réaction enzymatique se rapproche de l'influence de la concentration en substrat. A faible concentration d'activateur, la vitesse de la réaction augmente proportionnellement à la concentration en activateur - (la cinétique est du 1^{er} ordre), puis tend vers une limite (cinétique d'ordre zéro).

L'action d'un inhibiteur est plus complexe. L'inhibiteur forme, en général, un complexe réversible ou non avec l'enzyme. L'inhibition est dite réversible lorsque l'enzyme retrouve son activité dès que l'inhibiteur en est séparé, soit par dialyse, filtration sur gel ou autres techniques souvent longues et difficiles à mettre en oeuvre en phase homogène.

L'étude plus approfondie des phénomènes d'inhibition est plus aisée en phase hétérogène grâce à l'emploi de capteurs enzymatiques ; cette étude sera développée au cours des chapitres suivants.

4) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Dans la mesure où la réaction enzymatique met en jeu plusieurs étapes (fixation du complexe enzyme - substrat, dissociation du complexe en produits de réaction...), l'influence de la température T sur la vitesse de réaction k est la résultante des effets intermédiaires :

$$\frac{d(\text{Log } k)}{dt} = \frac{E}{RT^2}$$

E = énergie d'activation globale

R = constante des gaz parfaits.

Dans la plupart des cas, la vitesse de la réaction enzymatique double pour une augmentation de température de 10°C ; aussi pouvons-nous estimer qu'un contrôle de température à $\pm 0,1^\circ\text{C}$ est suffisant pour obtenir des résultats reproductibles.

La température utilisée pour suivre une réaction enzymatique est très discutée : certains estiment que 37°C est la température idéale pour suivre des réactions biologiques, d'autres pensent que 30°C est une température de travail plus aisée à réguler en particulier pour des pays chauds.

Pour notre part, nous avons suivi les recommandations de la commission IUPAC - IUB [1972], en régulant la température des réactions enzymatiques à 25°C.

5) EFFET DU pH

La plupart des enzymes sont actives dans un domaine limité de pH. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la stabilité de la protéine enzymatique est assurée dans une zone de pH à l'extérieur de laquelle l'enzyme est détruite.

Le pH optimal sera la valeur du pH correspondant à une affinité maximale de l'enzyme pour son substrat.

Très souvent, le pH optimal choisi est un compromis entre les différents pH optimaux des séquences de la réaction enzymatique.

6) EFFET DE LA FORCE IONIQUE

La présence de sels peut affecter la vitesse d'une réaction enzymatique, soit par déplacement de l'équilibre de formation du complexe activé,

soit par leur combinaison avec les réactants.

L'effet de sel primaire signalé par WARBURG [O. WARBURG - 1924] dans la variation de la constante de vitesse k , en fonction de la force ionique μ peut s'exprimer par :

$$\log k = \log k_o + Z_A Z_B \mu + (k_A + k_B - k^*) \mu$$

k_o = constante de vitesse à dilution infinie

Z_A, Z_B = charges des substances réagissantes A et B

k_A, k_B, k^* = coefficients empiriques pour A, B et le complexe activé.

Aussi, afin d'avoir des résultats reproductibles, la force ionique du système ne doit pas varier de façon appréciable.

III) RAPPEL DES DIFFERENTES METHODES DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DES ENZYMES EN SOLUTION

La mesure de la vitesse d'une réaction enzymatique peut se réaliser, soit en déterminant la variation de la concentration des composés après réaction totale [méthode de l'équilibre], soit en suivant l'évolution de la concentration des composés (substrats ou produits) au cours de la réaction enzymatique [méthode cinétique].

Il est préférable de suivre en continu une réaction enzymatique, sans avoir à faire ni de prélèvement, ni de titration.

Il faut alors pouvoir suivre la variation des propriétés physico-chimiques d'un composé de la réaction. On peut distinguer :

- méthodes manométriques
- méthodes spectrophotométriques
- méthodes polarimétriques
- méthodes électrochimiques

- méthodes fluorimétriques
- méthodes radiométriques.

1) METHODES MANOMETRIQUES

On mesure la variation de volume ou de pression des gaz consommés ou produits par la réaction enzymatique. Cette méthode a été initialement proposée par BANCROFT [J. BANCROFT - 1908] puis développée par WARBURG [O. WARBURG - 1924]. On mesure souvent la consommation d'oxygène (ex : glucose oxydase - peroxydase - cytochrome oxydase...) de dioxyde de carbone (ex : décarboxylase...) de NH_3 (ex : désaminase...) ou la libération d'ions H^+ à l'aide d'un milieu bicarbonate donnant lieu à dégagement de CO_2 .

2) METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES

Ce sont des méthodes utilisées si l'un des réactants absorbe dans l'ultraviolet, le visible ou l'infrarouge. Une thermorégulation précise est nécessaire.

3) METHODES POLARIMETRIQUES

La polarimétrie met en jeu la variation du pouvoir rotatoire des réactants. Comme les enzymes sont souvent très spécifiques des formes L ou D des composés tels que les sucres, cette technique s'applique souvent aux cinétiques enzymatiques des hydrates de carbone.

4) METHODES ELECTROCHIMIQUES

Les techniques potentiométriques, ampérométriques et polarographiques sont largement utilisées pour suivre la cinétique des réactions enzymatiques. On peut distinguer la potentiométrie à intensité faible et constante par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes en platine [G.G. GUIBAULT - 1962] (hydrolyse des esters de la thiocholine).

On peut aussi fixer le potentiel et mesurer la variation de courant après addition d'un réactif [W.J. BLAEDEL - 1964] (détermination de quantités de glucose par l'intermédiaire de l'oxydation du ferrocyanure en ferricyanure).

La polarographie et la coulométrie trouvent aussi des applications dans l'analyse biochimique. Les avantages et les inconvénients sont passés en revue par PURDY [W.C. PURDY - 1965].

La technique du pH - stat, un peu plus récente, s'applique aux réactions enzymatiques consommant ou libérant des ions H^+ . En maintenant constant le pH de la réaction par addition d'un acide ou d'une base, on peut non seulement suivre la vitesse de la réaction, mais aussi maîtriser la cinétique qui dépend du pH.

5) METHODES FLUORIMETRIQUES

La méthode utilisant la fluorescence permet une détection plus sensible que la méthode colorimétrique ($10^{-12}M$ au lieu de $10^{-6}M$). Le signal est maximal lorsque les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du composé sont optimales.

Un grand nombre de cinétiques enzymatiques utilisent la fluorescence des formes réduites NADH du nicotinamide adénine dinucléotide et NADPH du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. Cependant, il y a des problèmes d'interférence avec les protéines contenant de la tyrosine, fluorescente dans cette région.

6) METHODES RADIOCHIMIQUES

Ces méthodes utilisent le marquage avec des radioéléments, telle l'acétylcholine marquée au ^{14}C par REED et POHER [D.L. REED - 1966], [L.T. POHER - 1967].

CHAPITRE III

CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE

ENZYMES IMMOBILISEES

CHAPITRE III

CINETIQUE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE
ENZYMES IMMOBILISEESI) INTERET DES ENZYMES IMMOBILISEES

Au niveau cellulaire les enzymes se trouvent à l'état très organisé, souvent adsorbé dans des assemblages solides, membranes ou gels [E.S. KEMPNER - 1968]. Aussi l'étude des enzymes doit être conduite sous des conditions proches de leur existence in-vivo.

Immobiliser des enzymes dans une matrice synthétique ne revient pas obligatoirement à les placer dans leur environnement naturel, mais cela permet une approche plus adaptée par rapport à l'étude des enzymes en solution.

L'immobilisation des enzymes sur des supports synthétiques permet souvent d'augmenter leur stabilité mécanique vis-à-vis des membranes naturelles, rendant ainsi la manipulation plus aisée. D'autres avantages résident dans une maîtrise plus facile des paramètres cinétiques (hydrophobicité, matrices chargées imitant la nature polyélectrolyte des membranes naturelles).

D'autre part, l'étude de la réversibilité des enzymes vis-à-vis des inhibiteurs est nettement plus simple avec des enzymes fixées sur des supports que l'on peut à tout moment changer de milieu.

Les applications industrielles ont suivi aussi le développement des enzymes immobilisées. On produit des quantités très importantes de L-méthionine par un procédé entièrement automatique utilisant l'aminoacylase immobilisée [I. CHIBATA - 1972]. On peut citer aussi la production de l'acide 6-aminopénicillanique, utilisant la pénicilline amidase [D.A. SELF - 1969], ou l'élimination du lactose du lait par l'emploi de lactase immobilisée.

Dans le secteur médical, d'autres développements se font jour, comme la diminution du taux d'urée sanguine par l'uréase microencapsulée [T.M. CHANG -

1974] ou la fixation d'enzymes au niveau des liposomes pour leur utilisation en chimiothérapie [G. GREGORIADIS - 1973].

Les enzymes immobilisées peuvent donner lieu à des applications analytiques par l'intermédiaire des électrodes enzymatiques [G.G. GUIBAULT - 1975].

II) PROPRIETES DES ENZYMES IMMOBILISEES

Les enzymes immobilisées ont une cinétique souvent différente de celle des enzymes en solution. En effet, à la vitesse de réaction enzymatique proprement dite, il convient d'ajouter l'effet du microenvironnement qui conditionne toute l'activité catalytique. Ainsi, les phénomènes de diffusion créent des perturbations pour l'accès du substrat au niveau du site enzymatique. Le pH optimal de travail de l'enzyme immobilisée peut être différent de celui de l'enzyme en solution. D'une manière générale, les facteurs intervenant au niveau du site enzymatique diffèrent nettement de ceux du milieu extérieur. Ceci a pour conséquence, une variation de la vitesse maximale V_m et de la constante de MICHAELIS K_m de l'enzyme. Cette dernière peut avoir une valeur 10 fois supérieure.

Parmi les propriétés importantes et caractéristiques de l'immobilisation, citons : meilleure tenue de l'activité dans le temps et résistance apparente meilleure vis-à-vis de la dénaturation thermique.

L'immobilisation permet de prolonger la durée de vie des enzymes et en outre de les utiliser de façon répétée.

La modification de ces propriétés physicochimiques et cinétiques des enzymes après immobilisation exige la mise au point de méthodes autorisant une mesure de l'activité in-situ, les méthodes conventionnelles citées au chapitre précédent n'étant plus valables.

Il vient aussi à l'idée d'utiliser des capteurs que nous insérons dans le coeur même du support insoluble contenant l'enzyme pour mesurer son activité ou mieux d'enrober ces capteurs d'enzymes immobilisées dont les

propriétés géométriques (épaisseur...) et cinétiques (concentration en enzymes...) peuvent être maîtrisées. Nous pouvons ainsi réaliser des modèles d'étude plus justes et plus rapprochant des phénomènes naturels. Ces capteurs à enzymes immobilisées ont aussi des applications dans le domaine analytique, d'où le nom d'électrodes enzymatiques.

CHAPITRE IV

ELECTRODES ENZYMATQUES POUR L'ETUDE

DU COMPORTEMENT DES ENZYMES IMMOBILISEES

CHAPITRE IV

ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE
DU COMPORTEMENT DES ENZYMES IMMOBILISEESI) METHODOLOGIE D'ETUDE1) MODELE DE BASE

On considère un phénomène de diffusion-réaction d'un substrat S au sein d'une membrane enzymatique, d'épaisseur e, limitée à gauche par une électrode (figure 1).

L'électrode baigne dans une solution de substrat, de concentration fixe S_0 .

Moyennant les hypothèses Michaeliennes, le phénomène se modélise de la manière suivante :

$$(I) \quad \left[\begin{array}{l} \frac{\partial S}{\partial t} - D_s \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad - \text{substrat} - \\ \frac{\partial P}{\partial t} - D_p \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad - \text{produit} - \end{array} \right.$$

D_s, D_p : coefficients de diffusion effectifs du substrat et du produit dans la membrane

La membrane plonge dans une solution de volume tel que la concentration en substrat S reste constante, et que la concentration en produit p puisse être considérée comme négligeable.

$$(1) \quad \forall t \geq 0 \quad S(e, t) = S_0 \quad P(e, t) = 0$$

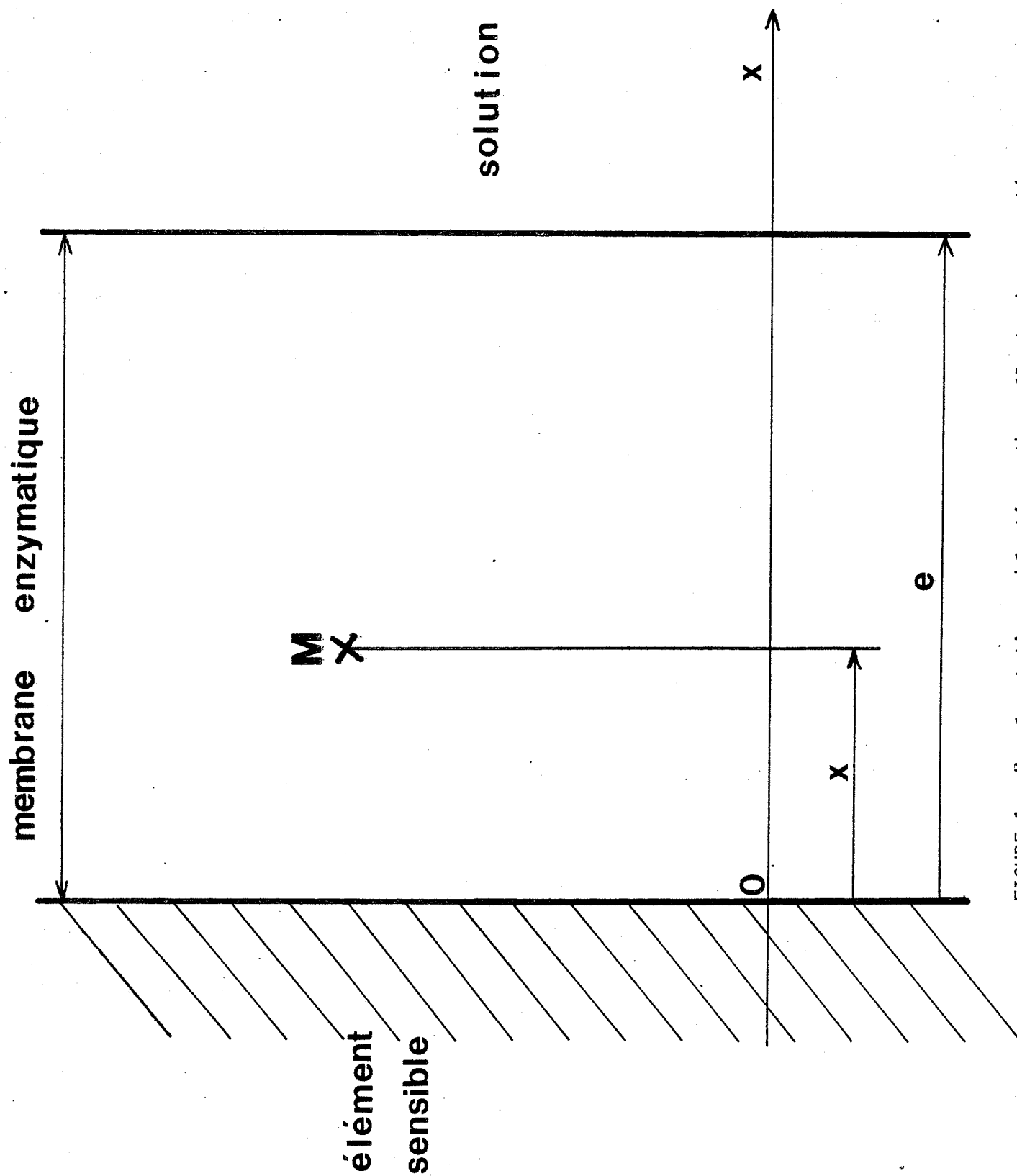


FIGURE 1 - Représentation schématique d'une électrode enzymatique au contact d'une solution de substrat.

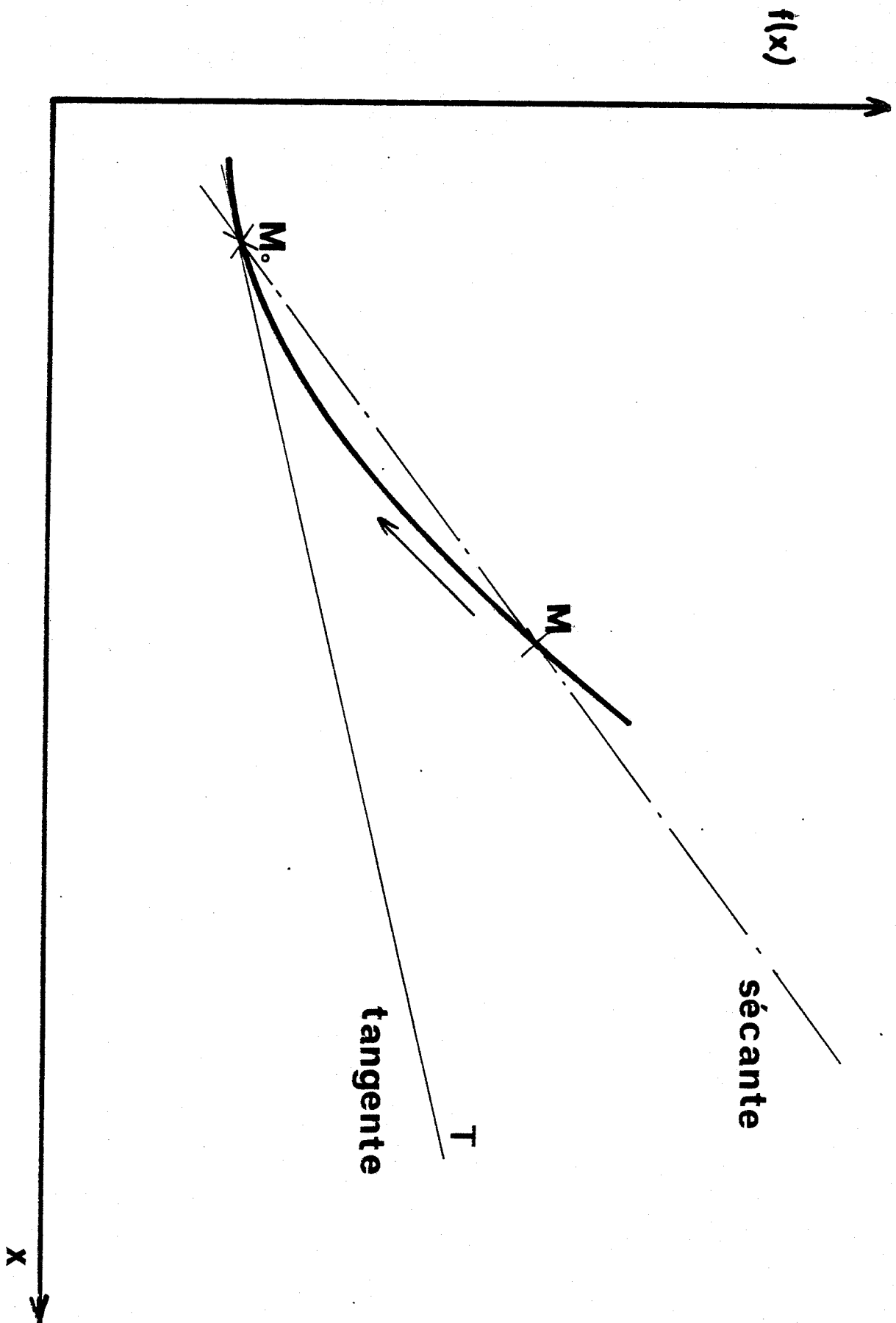


FIGURE 2 - Rappel mathématique de la définition de la tangente en un point M_0 d'une courbe $f(x)$
 $M_0 T = \lim_{M \rightarrow M_0} (droite M_0 M)$

La membrane est initialement vide de substrat et de produit :

$$(2) \quad \forall x \in [0, e] \quad S(x, 0) = 0 \quad P(x, 0) = 0$$

L'électrode est imperméable vis-à-vis du substrat, et du produit de la réaction : les flux de substrat et de produit sont donc nuls à l'interface électrode membrane.

$$(3) \quad \forall t > 0 \quad \frac{\partial S}{\partial x}(0, t) = \frac{\partial P}{\partial x}(0, t) = 0$$

Pour la commodité des calculs, nous admettons :

- les coefficients de diffusion du substrat et du produit au sein de la membrane ont des valeurs sensiblement égales.

$$D_s \approx D_p$$

- les valeurs de v_m et K_m restent constantes au sein de la membrane ; la température et le pH, en tout point de la membrane, ne devront pas subir de variations significatives.

$$\forall t \geq 0, \quad \forall x \in [0, e] \quad (v_m, K_m) \text{ constants}$$

2) ANALOGIE DES PROFILS DE CONCENTRATION DANS UNE COUCHE ACTIVE FIXÉE SUR ÉLECTRODE ET DANS UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE

Analytiquement, la traduction de la condition (3) n'est pas aisée, car la tangente en un point d'une courbe est la position limite d'une droite sécante M_0M lorsque le point M tend vers le point M_0 (figure 2).

Aussi contourne-t-on la difficulté mathématiquement en prenant une membrane d'épaisseur double $[-e, +e]$ plongeant dans une solution de substrat de concentration fixe S_0 (figure 3).

Les profils de concentration admettent un axe de symétrie

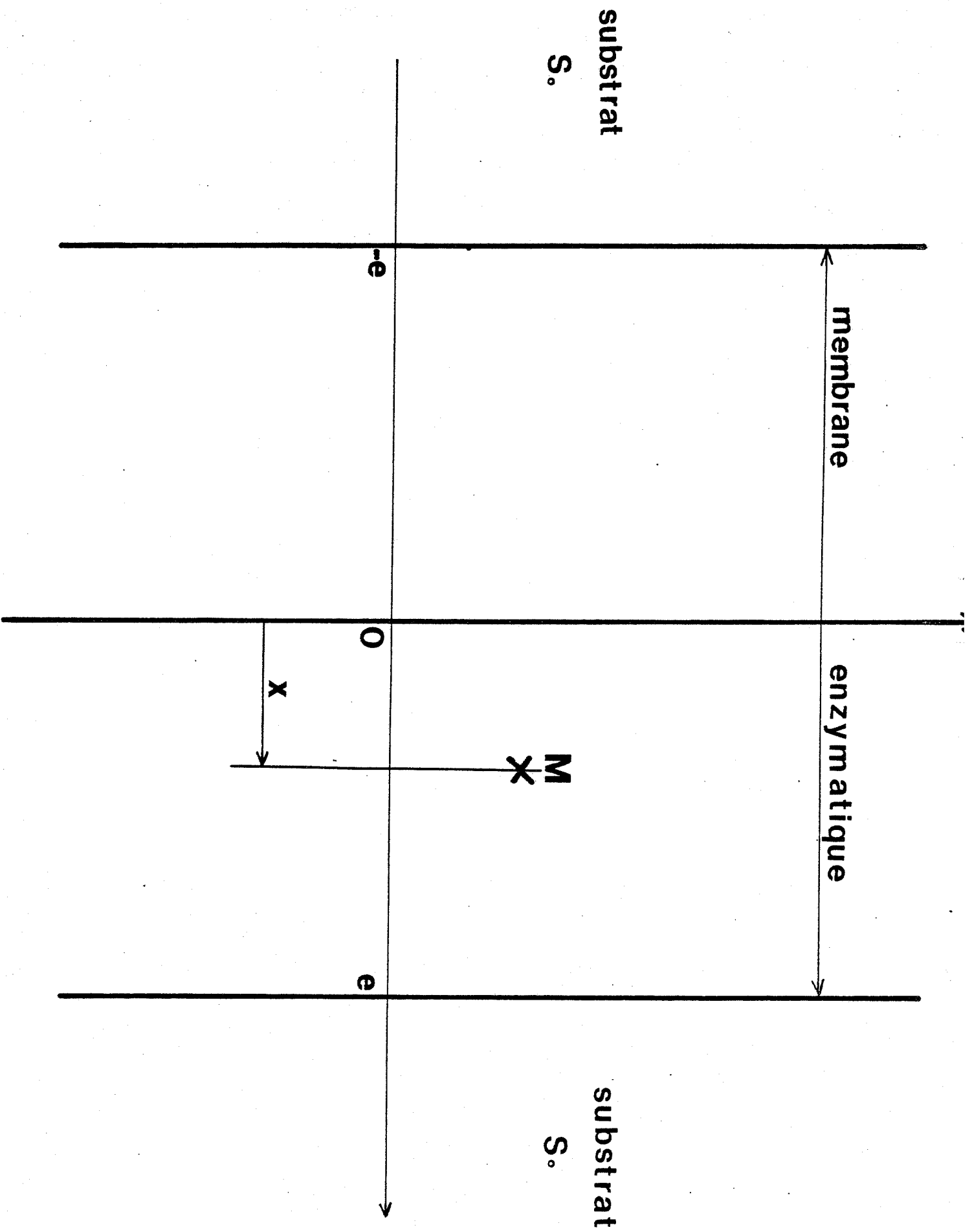


FIGURE 3 - Modèle utilisé dans l'analyse numérique pour la détermination des profils de concentrations.

($x = 0$), donc une tangente de pente nulle en ce point.

Les équations de diffusion - réaction (I) restent identiques.
Les conditions aux bornes deviennent :

$$(1') \quad \forall t \geq 0 \quad \left[\begin{array}{l} S(e,t) = S(-e,t) = S_0 \\ P(e,t) = P(-e,t) = 0 \end{array} \right.$$

$$(2') \quad \forall x \in [-e,e] \quad S(x,0) = P(x,0) = 0$$

La condition (3) n'a plus lieu de figurer. Afin d'avoir les profils correspondants à la variation de concentration du substrat et du produit au sein de la membrane, il suffira de prendre ceux obtenus en résolvant le système (I), avec les conditions aux bornes (1') et (2'), uniquement sur le domaine $[0,e]$.

II) MATERIELS ET METHODES

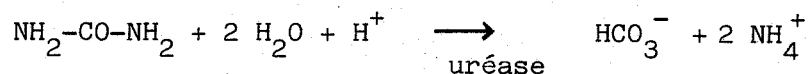
1) REACTIFS

a) Enzymes

Trois enzymes ont été utilisées, à savoir :

- uréase : SIGMA, type VI, en poudre à 5,1 unités par mg environ. Par définition, 1 unité d'uréase est la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mole de NH_3 par minute à $\text{pH} = 7,0$ et à la température de 25°C .

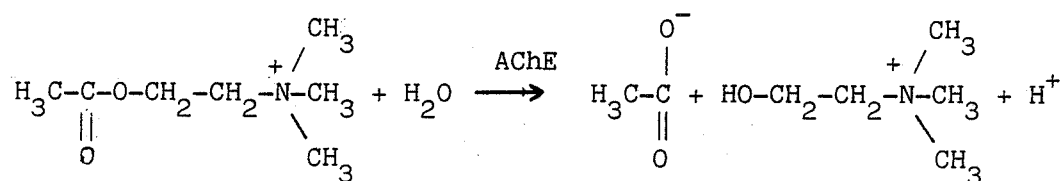
L'uréase est tirée de la fève JACK (*Canavalia Ensiformis*) et a été la première enzyme isolée à l'état cristallisé [J.B. SUMMER - 1926]. Elle appartient au groupe des amidases. Chez l'homme on signale sa présence dans le suc gastrique [L. MARTIN - 1933]. Elle catalyse la décomposition de l'urée en carbonate d'ammonium selon la réaction [J.B. SUMMER - 1951] :



Sa masse moléculaire est d'environ 483000 et sa constante de MICHAELIS K_m , déterminée en solution, est comprise entre $1,05 \times 10^{-2}$ et $3 \times 10^{-2} \text{M}$ selon sa provenance et le pH [THOMAS - 1969].

- acétylcholinestérase : SIGMA, type VI-S, en poudre à 350 Unités/mg environ. Par définition 1 unité d'acétylcholinestérase est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μmole d'acétylcholine en choline et acétate par minute à pH = 8,0 et à la température de 37°C.

L'acétylcholinestérase (AChE) que l'on trouve dans les jonctions nerveuses hydrolyse la liaison ester de l'acétylcholine selon la réaction :



L'AChE a été purifiée et cristallisée récemment à partir de l'organe électrique d'un poisson : le Gymnote et les études faites en microscopie électronique sur l'enzyme purifiée par chromatographie d'affinité, ont montré trois formes moléculaires D, C et A composées respectivement de 3, 2 et 1 tétramères associées à une "queue" formant structure [J. CARTAUD - 1975]. Toutes les formes de l'acétylcholinestérase possèdent le même K_m [J. MASSOULIE - 1975] de l'ordre de $9 \times 10^{-5} \text{M}$ [I.B. WILSON - 1958] à pH = 7,0 et ne paraissent pas correspondre à des états catalytiquement distincts.

L'acétylcholine est le neuro transmetteur responsable de la dépolarisation de la membrane synaptique et qui propage électriquement l'influx nerveux. L'acétylcholinestérase présente dans la membrane postsynaptique a pour rôle d'hydrolyser l'acétylcholine afin de re-polariser cette membrane après le stimuli. Au niveau de l'organisme, l'inhibition de l'AChE empêche la dégradation de l'acétylcholine produite par les premières impulsions nerveuses.

Les impulsions suivantes provoquent un accroissement du taux d'acétylcholine conduisant d'abord à une sur-stimulation des nerfs, puis à la paralysie et à la mort par suite de défaillance respiratoire. On voit l'importance de l'étude de l'ACHE immobilisée sous forme membranaire.

- uricase : SIGMA, type IV, en poudre soluble à 2,5 Unités/mg environ. Par définition, 1 unité d'uricase est la quantité d'enzyme qui transforme 1 μ mole d'acide urique en allantoiné par minute à pH = 8,5 et à la température de 25°C.

b) Substrats

L'urée, l'acide urique proviennent de PROLABO, l'acétylcholine de chez SIGMA.

c) Produits intervenant lors de la réalisation des membranes

- albumine humaine : Centre de Transfusion Sanguine de LYON, à 20g/100ml.
- aldéhyde glutarique : Solution aqueuse à 25% de PROLABO.

d) Solution tampon

Les solutions tampon sont réalisées en mélangeant une solution de Na_2HPO_4 0,25 M avec une solution de NaH_2PO_4 0,25 M. Cette solution tampon sera appelée par la suite tampon phosphate.

2) APPAREILLAGE

Electrodes utilisées :

- électrode NH_4^+ : Beckmann ronde 39137 ou Philips Plate IS 561
- électrode CO_2 : Radiometeur E 5036

- électrode pH plate : Radiometer G 242C
Tacussel TSB/HS

L'électrode choisie, recouverte de sa membrane enzymatique est reliée, soit à un pH-mètre RADIOMETER PHM64, soit à un enregistreur TACUSSEL EPL2, muni d'un tiroir électrométrique TVED. L'électrode plonge dans une solution tamponnée thermorégulée à 25°C au moyen d'un thermostat LAUDA et agitée avec un agitateur magnétique.

3) METHODE D'IMMOBILISATION

Historiquement, l'idée d'immobiliser des enzymes sur un support insoluble remonte à 1906 [v. HENRI - 1906]. Mais c'est surtout à partir de 1960 que l'immobilisation des enzymes effectue des progrès énormes [I.H. SILMAN - 1966, G. KAY - 1968, G. BROUN - 1969, G. BROUN - 1970, KATCHALSKI-1971, G.R. STARK - 1971, G. MANECKE - 1972, H.D. ORTH - 1972, E. SELEGNY - 1974]

On peut regrouper ces méthodes d'immobilisation en 3 classes :

- 1/ adsorption sur un support inerte ou échangeur d'ions
- 2/ inclusion dans un gel ou un polymère
- 3/ liaison covalente directe entre l'enzyme et le support ou indirecte au moyen d'un agent polyfonctionnel.

La méthode utilisée, tout au long de nos travaux est du type 3, utilisant un agent polyfonctionnel [aldéhyde glutarique] et une protéine de charge [albumine humaine].

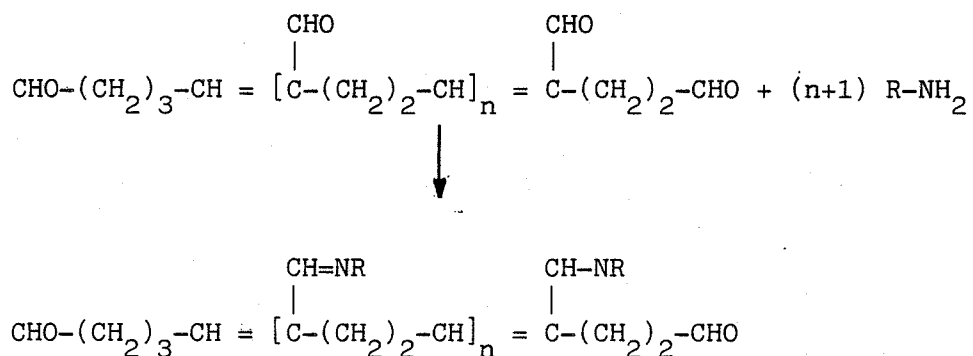
a) Méthode

- 1/ l'enzyme est dissoute dans la solution d'albumine humaine
- 2/ la solution d'aldéhyde glutarique, éventuellement diluée, est ajoutée afin d'assurer la co-réticulation de l'albumine et de l'enzyme

- 3/ Si la surface active de l'électrode est plate :
 le mélange est aussitôt étendu sur le support afin de former un film d'épaisseur sensiblement constante. Si la surface active de l'électrode est sphérique, la partie active de l'électrode est plongée dans la solution. Après l'avoir retirée, on imprime alors des mouvements de rotation afin que le film formé ait une épaisseur sensiblement constante en tout point (figure 4).
- 4/ Le film acquiert au bout d'un certain temps dit "temps de réticulation", des caractéristiques mécaniques intéressantes. Ce temps peut varier de quelques minutes à plusieurs heures, selon les performances que l'on désire obtenir.
- 5/ L'électrode recouverte de sa membrane est alors rincée et placée dans une solution contenant un tampon de pH bien défini, afin d'éviter la déshydratation de la membrane et en conséquence son éclatement.

b) Principe de l'immobilisation

L'immobilisation au moyen de l'aldéhyde glutarique peut être mise en évidence par la réaction :



R = protéine ou support aminé

c) Avantages de la méthode

- Méthode simple, facile à mettre en oeuvre.

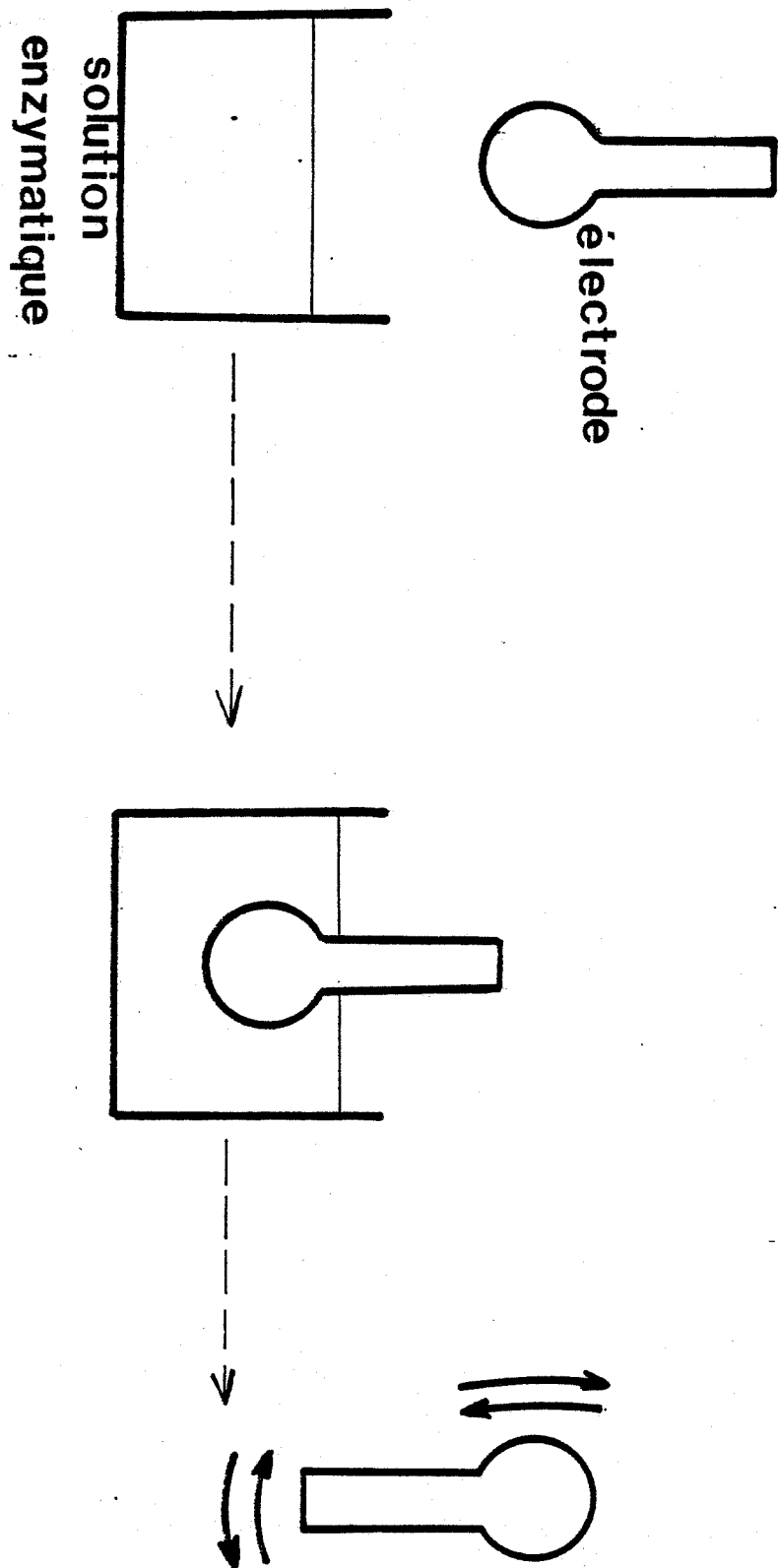


FIGURE 4 - Fabrication d'une membrane enzymatique sur une électrode ayant un élément sensible sphérique.

- méthode permettant la fixation polyvalente de la quasi-totalité des enzymes, sur des supports de nature et de forme variées.
- possibilité de contrôler l'épaisseur de la membrane.
- membrane ayant une résistance mécanique correcte.

d) Inconvénients

L'enzyme perd une partie de son activité au cours de l'immobilisation.

e) Durée de vie de l'enzyme

Les essais réalisés avec l'uréase et l'acétylcholinestérase montrent que la durée de vie des enzymes augmente, une fois celles-ci fixées.

Par exemple, l'acétylcholinestérase fixée a une activité sensiblement constante sur plusieurs mois, moyennant des précautions élémentaires de conservation, hors utilisation pratique (trempage dans une solution contenant un tampon phosphate 0,25 M, pH = 7,0 à température ambiante), alors qu'en solution, l'activité est très altérée au bout de quelques jours.

CHAPITRE V

ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE

DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE

ASPECTS THEORIQUES

CHAPITRE V

ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE ASPECTS THEORIQUES

I RAPPEL

A l'état stationnaire, dans le cadre de l'hypothèse Michaelienne, le système d'équations modélisant l'étude de l'activité enzymatique en phase hétérogène, s'écrit :

$$(I) \quad \left[\begin{array}{l} -D \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad (1) \\ -D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad (2) \end{array} \right. \quad \forall x \in [-e, +e]$$

$$\text{avec} \quad S(e) = S(-e) = S_0 \quad (3) \quad P(e) = P(-e) = 0 \quad (4)$$

Les courbes donnant les profils de $[S]$ et $[P]$ en fonction de x s'obtiennent en résolvant le système (I), complété des conditions aux limites (3) et (4). La condition

$$\frac{\partial S}{\partial x}(x=0) = \frac{\partial P}{\partial x}(x=0) = 0$$

est alors réalisée. Les profils de $[S]$ et $[P]$ à l'intérieur de la membrane seront ceux du système précédent, mais sur l'intervalle $[0, e]$ uniquement.

Avant d'aborder l'étude au moyen de l'analyse numérique, nous nous sommes tout d'abord placés dans le cadre où les solutions sont connues analytiquement, à savoir les cinétiques d'ordre 1 et d'ordre 0.

II) APPROXIMATION PAR LA CINÉTIQUE D'ORDRE 1

1) CONDITIONS DE VALIDITÉ

Effectuer l'approximation par la cinétique d'ordre 1, à l'état stationnaire, revient à remplacer le système d'équations I par le système

$$(II) \quad \begin{cases} -D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{V_m}{K_m} u = 0 \\ -D \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - \frac{V_m}{K_m} u = 0 \end{cases}$$

$$u(e) = u(-e) = S_0$$

avec

$$v(e) = v(-e) = 0$$

L'étude de l'approximation d'ordre 1 [F. CONRAD - 1980] permet de conclure à la double inégalité :

$$0 \leq S(x) - u(x) \leq \frac{1}{2} \frac{V_m}{D} \left(\frac{S_0 e}{K_m} \right)^2 \quad \forall x \in [-e, +e]$$

$$\text{Or} \quad \frac{1}{2} \frac{V_m}{D} \left(\frac{S_0 e}{K_m} \right)^2 = \frac{1}{2} \frac{V_m e^2}{DK_m} \times \frac{S_0^2}{K_m}$$

$$\text{en posant} \quad \sigma = \frac{V_m e^2}{DK_m}$$

$$\text{on obtient} \quad 0 \leq S(x) - u(x) \leq \frac{1}{2} \sigma \frac{S_0^2}{K_m}$$

En conclusion, l'approximation d'ordre 1 sera d'autant plus fine que l'expression $\sigma S_o^2/K_m$ sera petite.

Soit

$$\sigma \frac{S_o^2}{K_m} \ll 1$$

L'approximation d'ordre 1, de manière plus globale, sera d'autant meilleure que :

$$\left(\frac{V_m e^2}{D}\right) \left(\frac{S_o}{K_m}\right)^2 \ll 1$$

$$\frac{V_m e^2}{D} \text{ étant constant, donc}$$

$$S_o \ll K_m$$

Lorsque S_o est petit par rapport à K_m ($S_o/K_m \ll 1$) on retrouve l'analogie avec la cinétique d'ordre 1 des enzymes en phase homogène.

Mais cette condition n'est pas suffisante pour impliquer la cinétique d'ordre 1 en phase hétérogène, compte tenu de la présence de toutes les caractéristiques de la membrane (V_m , K_m , e , D) mises en évidence dans l'expression de l'erreur ϵ

$$\epsilon = \frac{V_m e^2}{D} \left(\frac{S_o}{K_m}\right)^2 \ll 1$$

On notera par ailleurs, que la variation du rapport S_o à K_m , passe en phase hétérogène de la puissance d'ordre 1 à celle d'ordre 2.

2) RESOLUTION

$$\text{En posant } \lambda^2 = \frac{\bar{V}_m}{DK_m}$$

on obtient $\forall x \in [0, e]$

$$P(x) = S_0 \left[1 - \frac{\text{ch}(\lambda x)}{\text{ch}(\lambda e)} \right] = \left[1 - \frac{\text{ch} \lambda e \left(\frac{x}{e} \right)}{\text{ch} \lambda e} \right]$$

D'un point de vue expérimental, seul $[P](x=0)$ [noté $P(0)$] est facilement accessible à la mesure.

$$P(0) = S_0 \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \right]$$

$$\text{soit} \quad \text{Log } P(0) = \text{Log } S_0 + \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \right]$$

On trace dans un diagramme bi-logarithmique, la variation de $P(0)$ en fonction de S_0 , concentration initiale en phase aqueuse. La courbe obtenue est une droite de pente égale à 1, quelles que soient les caractéristiques de la membrane.

$$\text{D'autre part} \quad 1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \leq 1 \Rightarrow \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \right] \leq 0$$

Par conséquent, toutes les droites obtenues sont obligatoirement situées au dessous de la droite

$$\text{Log } P(0) = \text{Log } S_0$$

dite droite limite.

Toutefois, on notera que si :

$$\lambda e = \sqrt{\sigma} \gg 1 \Rightarrow 1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \approx 1 \Rightarrow \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)} \right] \approx 0$$

La droite obtenue est située très près de la droite limite, et expérimentalement se confondra avec la droite limite.

III) APPROXIMATION PAR LA CINETIQUE D'ORDRE 0

1) VALIDITE DE L'APPROXIMATION

Effectuer l'approximation par une cinétique d'ordre 0 revient, à l'état stationnaire, à remplacer le système d'équation (I) par le système :

$$\text{III} \quad \left[\begin{array}{l} -D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + V_m = 0 \\ -D \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - V_m = 0 \end{array} \right.$$

$$\text{avec} \quad \left[\begin{array}{l} u(e) = u(-e) = S_o \\ v(e) = v(-e) = 0 \end{array} \right.$$

L'étude de l'approximation [F. CONRAD - 1980] permet de conclure à la double inégalité :

$$0 \leq S(x) - u(x) \leq \frac{K_m}{\frac{2D}{V_m e^2} (K_m + S_o) - 1} \quad \forall x \in [-e, +e]$$

Pour que l'expression ait un sens on suppose :

$$\frac{V_m e^2}{2D} < S_o$$

l'erreur est :

$$\epsilon = \frac{K_m}{\frac{2D}{V_m e^2} (K_m + S_o) - 1} = \frac{\frac{K_m}{S_o}}{\frac{2D}{V_m e^2} \left(1 + \frac{K_m}{S_o}\right) - \frac{1}{S_o}}$$

Bien entendu, si $\frac{S_o}{K_m} \gg 1$ alors $\frac{K_m}{S_o} \approx 0$

et l'erreur ϵ tend vers 0.

De manière globale l'approximation d'ordre 0 sera atteinte si $S_0 \gg K_m$, et $V_m e^2 / 2D < S_0$. L'erreur est une expression complexe faisant intervenir à la fois S_0 , K_m mais aussi D coefficient de diffusion et e , épaisseur de la membrane. La connaissance des quatre constantes (V_m , K_m , e , D) semble donc nécessaire, si on veut pouvoir estimer la validité de l'approximation d'ordre 0, contrairement à la cinétique enzymatique en phase homogène où l'approximation d'ordre 0 ne dépend que du rapport S_0/K_m .

2) RESOLUTION

La résolution du système d'équations (III) donne :

$$\forall x \in [0, e] \quad P(x) = \frac{V_m}{2D} (e^2 - x^2)$$

Expérimentalement, seule la mesure de la concentration à l'interface $[P(0)]$ est facilement accessible.

$$\text{Soit} \quad P(0) = \frac{V_m e^2}{2D}$$

Cette valeur est indépendante de S_0 et de K_m .

$$P(0) = \text{Constante} \quad \Rightarrow \quad \text{Log } P(0) = \text{Constante}$$

Lorsque S_0 croît indéfiniment, on tend vers la cinétique d'ordre 0. Par conséquent, la courbe donnant la variation de $P(0)$ en fonction de S_0 , concentration en substrat dans la phase aqueuse, présente un palier.

IV) RESOLUTION A L'ETAT STATIONNAIRE, AU MOYEN DE L'ANALYSE NUMERIQUE

Indépendamment de toute approximation (ordre 0 ou ordre 1), l'analyse

numérique permet de résoudre le système d'équations (I), à l'état stationnaire, de façon complète.

1) MODELISATION A L'ETAT STATIONNAIRE

On effectue le changement de variable :

$$x' = \frac{x}{e} \quad \text{et} \quad t' = \frac{t}{e^2/D}$$

x' et t' sont alors des variables sans dimensions.

De même, en choisissant K_m comme unité de concentration, on pose :

$$s = \frac{[S]}{K_m} \quad \text{et} \quad p = \frac{[P]}{K_m}$$

s et p sont alors sans dimensions.

Le système d'équations (I) s'écrit, à l'état stationnaire :

$$I' \quad \begin{cases} -\frac{\partial^2 s}{\partial x'^2} + \sigma \frac{s}{1+s} = 0 & (1) \\ -\frac{\partial^2 p}{\partial x'^2} - \sigma \frac{s}{1+s} = 0 & (2) \end{cases} \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{V_m}{K_m} \frac{e^2}{D}$$

avec les conditions

$$s(1) = s(-1) = s_o \quad s_o = \frac{[S_o]}{K_m}$$

$$\text{et} \quad p(1) = p(-1) = 0$$

2) DISCRETISATION DU MODELE

L'axe de x est découpé en $2m$ intervalles constants de longueur

Δ ; tel que $\Delta = \frac{1}{m}$

Les équations (1) et (2) du système (I') s'écrivent :

$$\forall j \in [1, 2m]$$

$$\text{II}' \left[\begin{array}{l} - \frac{s_{j+1} - 2s_j + s_{j-1}}{\Delta^2} + \sigma \frac{s_j}{1 + s_j} = 0 \quad (3) \\ - \frac{p_{j+1} - 2p_j + p_{j-1}}{\Delta^2} + \sigma \frac{s_j}{1 + s_j} = 0 \quad (4) \end{array} \right.$$

avec les conditions initiales

$$\text{et} \left[\begin{array}{l} s_1 = s_{2m} = s_0 \\ p_1 = p_{2m} = 0 \end{array} \right.$$

3) APPROXIMATION DU MODELE DISCRETISE

La méthode de calcul numérique consiste à passer d'un état $n \geq 0$ à l'état $n + 1$, en résolvant :

Hypothèse A :

$$- \left[\frac{s_{j+1}^{n+1} - 2s_j^n + s_{j-1}^n}{\Delta^2} \right] + \sigma \frac{s_j^n}{1 + s_j^n} = 0$$

$$\forall j \in [2, 2m - 1] \quad \text{et} \quad s_0^n = s_{2m}^n = s_0 \quad \forall n \geq 0$$

Hypothèse B :

[KERNEVEZ - 1972]

$$-\left[\frac{s_{j+1}^{n+1} - 2s_j^{n+1} + s_{j-1}^{n+1}}{\Delta^2} \right] + \sigma \frac{s_j^n}{1 + s_j^n} = 0$$

$$\forall j \in [2, 2m-1] \quad \text{et} \quad s_0^n = s_{2m}^n = s_0 \quad \forall n \geq 0$$

Hypothèse C :

$$-\left[\frac{s_{j+1}^{n+1} - 2s_j^{n+1} + s_{j-1}^{n+1}}{\Delta^2} \right] + \sigma \frac{s_j^{n+1}}{1 + s_j^n} = 0$$

$$\forall j \in [2, 2m-1] \quad \text{et} \quad s_0^n = s_{2m}^n = s_0 \quad \forall n \geq 0$$

à partir d'un état initial :

$$\forall j \in [2, 2m-1] \quad s_j^0 = 0 \quad \text{avec} \quad s_1^0 = s_{2m}^0 = s_0$$

Dans les trois cas, le calcul est terminé lorsque :

$$\forall j \in [1, 2m] \quad \text{Max}_j [s_j^{n+1} - s_j^n] < \beta$$

β étant l'erreur maximale autorisée, fixée dès le début de l'étude.

La connaissance de $s(x)$, permet d'atteindre facilement $p(x)$, en tout point de la membrane. En effet, en additionnant les équations (1) et (2) de (I') on obtient :

$$\frac{\partial^2 s}{\partial x'^2} + \frac{\partial^2 p}{\partial x'^2} = 0$$

$$\text{soit} \quad \forall x \in [-1, +1] \quad s(x) + p(x) = ax + b$$

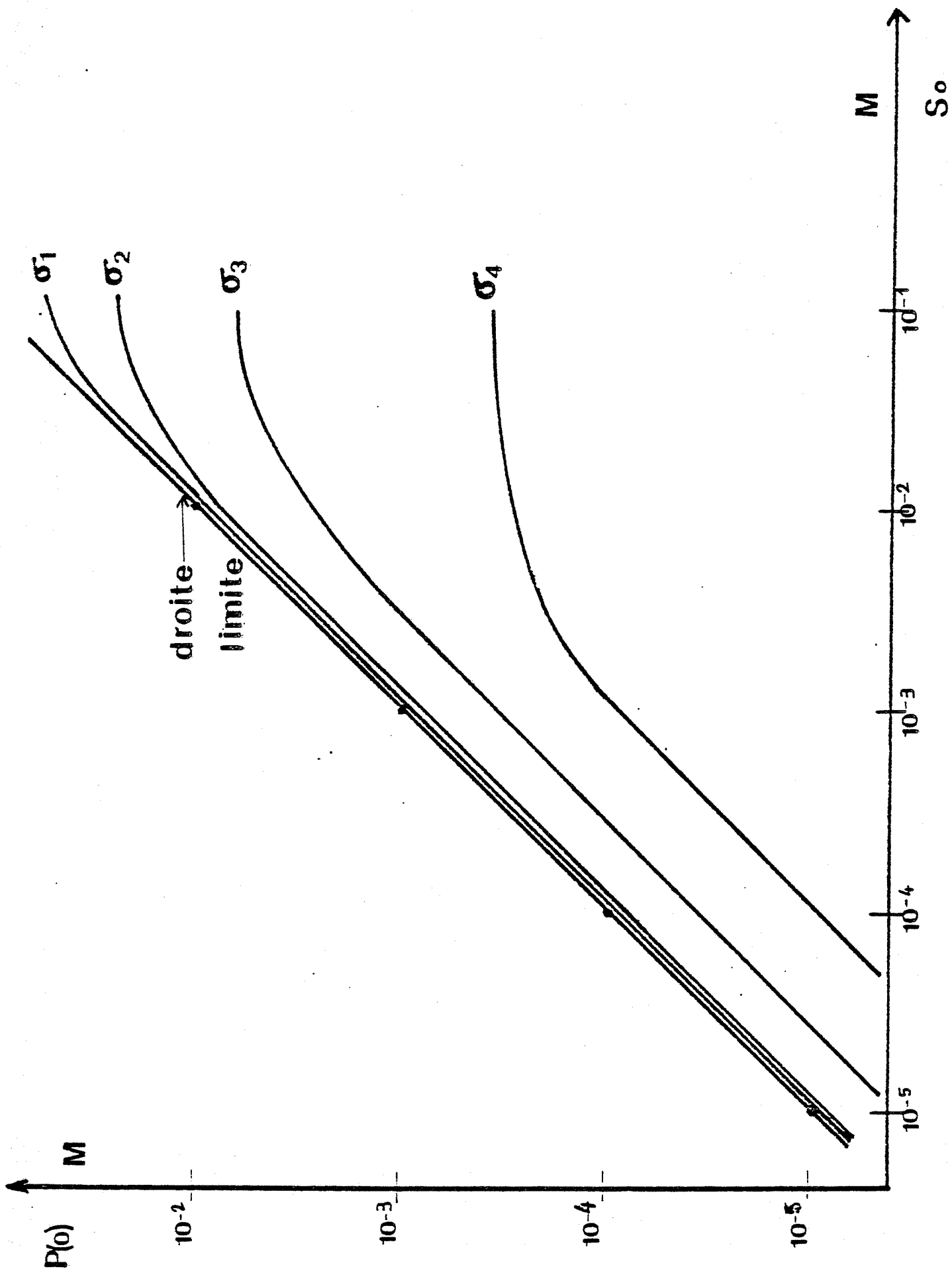


FIGURE 1 - Variation de $P(o)$ en fonction de S_o dans un diagramme bi-logarithmique pour différentes caractéristiques de la membrane. $\sigma_1 > \sigma_2 > \sigma_3 > \sigma_4$, $\sigma = \frac{m e^2}{DK}$

Compte tenu des conditions initiales et aux limites, on obtient :

$$\forall x \in [-1, +1] : s(x) + p(x) = s_0$$

$$\text{soit } \forall j \in [1, 2m] \quad s_j^n + p_j^n = s_0$$

4) CONCLUSION

Les résultats permettant d'obtenir, dans un diagramme bi-logarithmique la variation de $[P]_{(x=0)}$ en fonction de S_0 , à partir des hypothèses A, B et C sont sensiblement identiques à l'état stationnaire (figure 1). On retrouve ceux obtenus dans le cadre de la cinétique d'ordre 1 et d'ordre 0, abordé précédemment.

V) PROFILS DE CONCENTRATION DU SUBSTRAT ET DU PRODUIT A L'INTERIEUR DE LA MEMBRANE

L'étude menée au moyen de l'analyse numérique permet, non seulement de déterminer le profil de $P(0)$ en fonction de S_0 , mais aussi la valeur de $[S]$ et $[P]$ en tout point de la membrane, ceci en fonction d'une seule caractéristique globale :

$$\sigma = \frac{V_m e^2}{DK_m} = \lambda^2 e$$

Ce module met en évidence l'importance de la diffusion au sein des membranes à enzymes immobilisées, que l'on peut observer expérimentalement [J. MUELLER - 1982], [V.S. PATWARDHAN - 1982].

Les figures 2 et 3 mettent en évidence la variation de $[S]$ et $[P]$ en tout point de la membrane enzymatique.

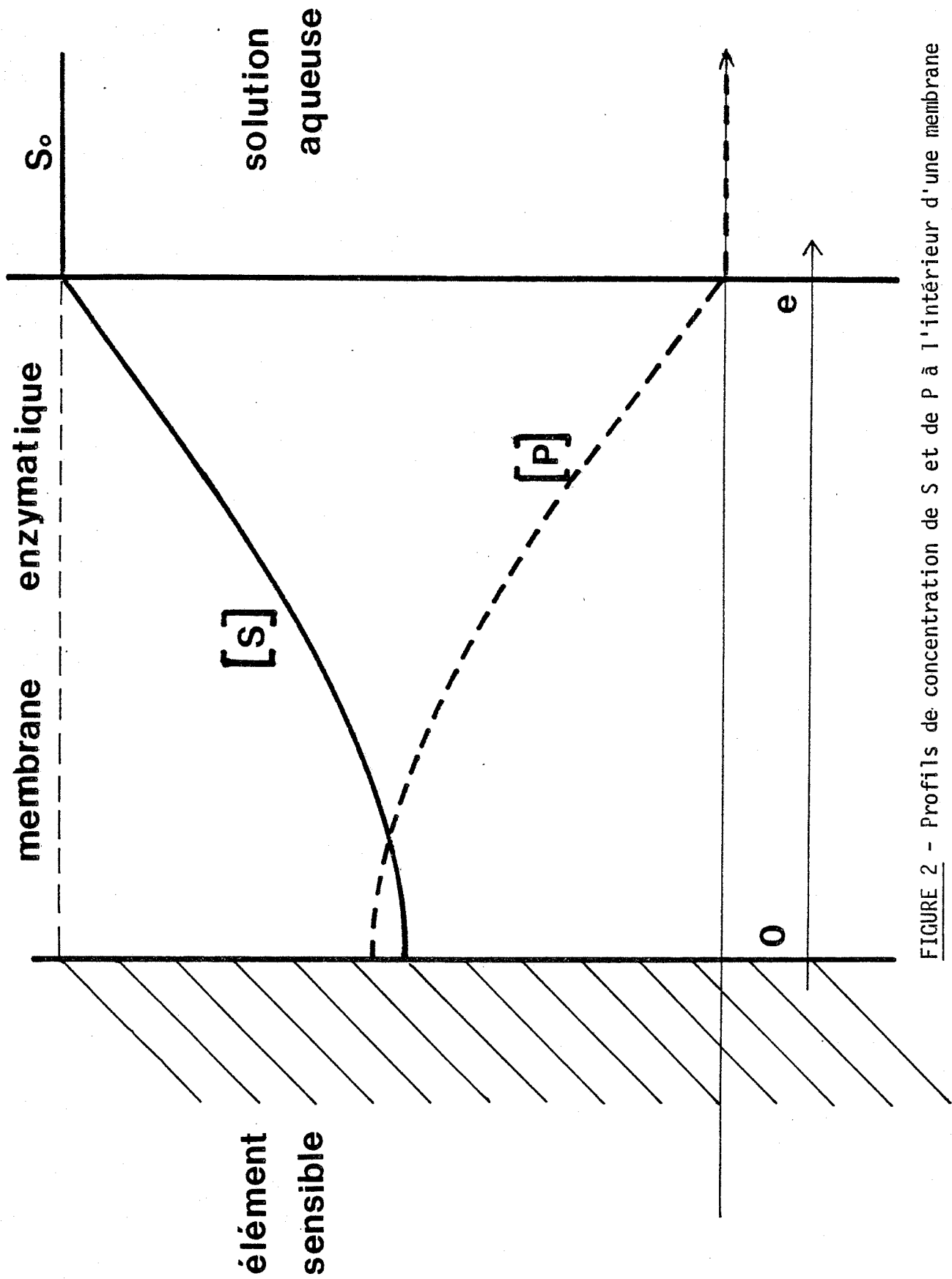


FIGURE 2 - Profils de concentration de S et de P à l'intérieur d'une membrane enzymatique à faible activité (σ faible).

Cas n°1 : membrane peu active (σ faible): figure 2

Au sein de la membrane enzymatique la concentration en substrat diminue lorsqu'on se rapproche de l'interface électrode/membrane enzymatique, sans jamais s'annuler.

En particulier en $x = 0$, (expérimentalement, c'est le seul point facilement accessible à la mesure) :

$$[S](x = 0) = S(0) > 0$$

par conséquent $P(0) < S_0$

Cas n°2 : membrane fortement active (σ élevé): figure 3

La concentration en substrat devient pratiquement nulle (zone gelée où l'enzyme ne travaille pas) bien avant d'avoir atteint l'interface électrode/membrane enzymatique.

En particulier en $x = 0$,

$$S(0) = 0 \quad \text{et} \quad P(0) = S_0$$

La concentration en produit en $x = 0$ ne peut en aucun cas être supérieure à la concentration en substrat dans la phase aqueuse, ce qui explique la présence de la droite limite sur le diagramme $\text{Log } [P(0)]$ en fonction de $\text{Log } (S_0)$.

On retrouve l'analogie mathématique avec le problème "frontière libre" qui apparaît comme cas limite lorsque $\sigma \rightarrow \infty$ [C.M. BRAUNER - 1979].

VI) IDENTIFICATION DES CONSTANTES V_m , K_m , e et D D'UNE MEMBRANE ENZYMATIQUE

1) PRELIMINAIRE

L'étude mathématique réalisée précédemment montre que l'accès

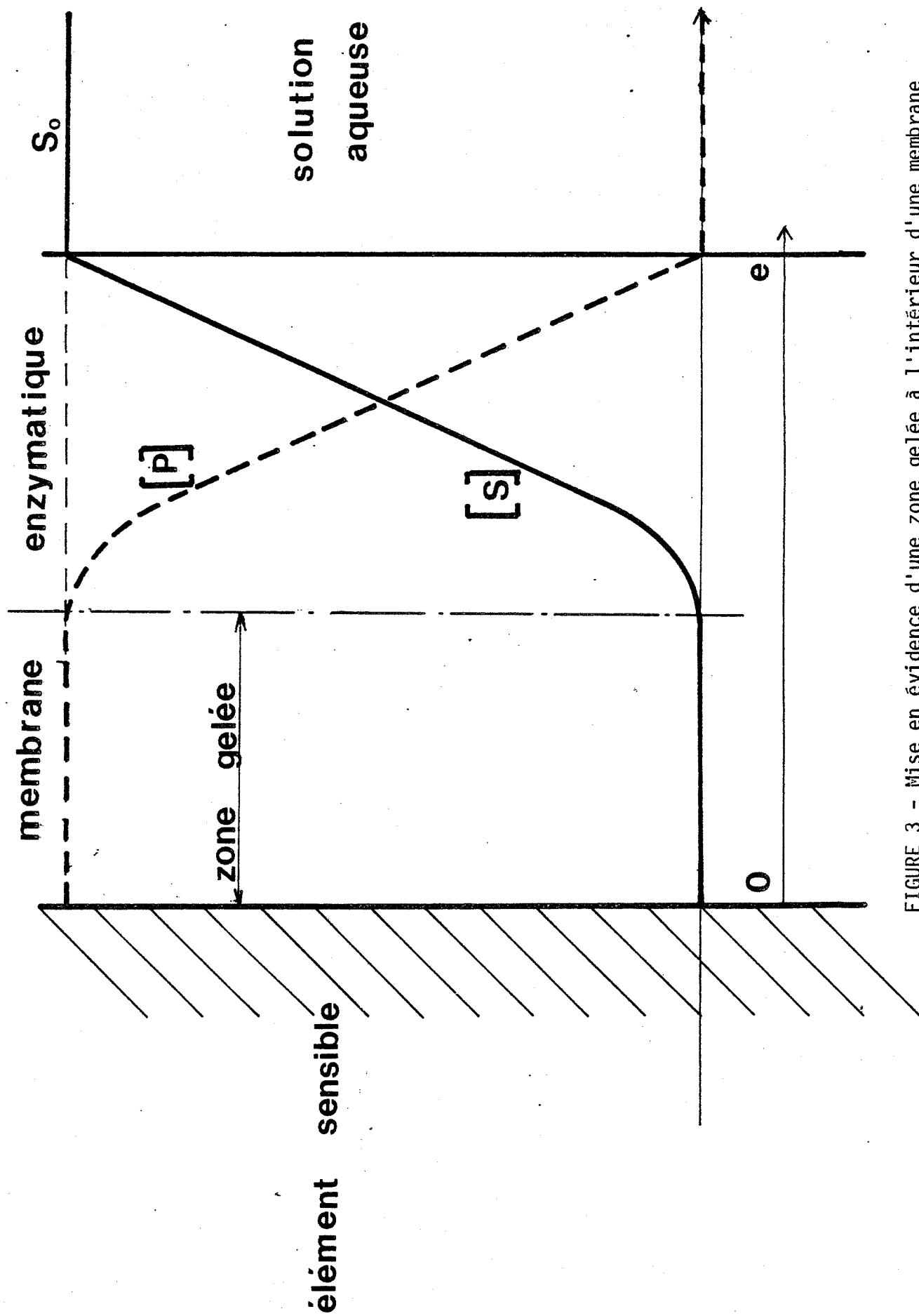


FIGURE 3 - Mise en évidence d'une zone gelée à l'intérieur d'une membrane enzymatique à "activité élevée" (σ élevé)

aux constantes V_m (vitesse maximale), K_m (constante de MICHAELIS), e (épaisseur de la membrane) et D (coefficient de diffusion) est possible à partir des données expérimentales.

En phase homogène, la méthode de LINEWEAVER - BURK [J.B. SUMMER 1951] permet, en traçant $(1/v)_{t=0}$ en fonction de $1/S_0$, d'atteindre les valeurs expérimentales de V_m et K_m .

En phase hétérogène, cette méthode n'est plus valable, car les hypothèses de base ne sont plus vérifiées. Ceci a été confirmé récemment par K. LEE [K. LEE - 1981] malgré l'intérêt que présente la connaissance des paramètres cinétiques dans la modélisation des réacteurs biologiques.

D'autre part, deux variables se rajoutent, à savoir l'épaisseur de la membrane e et le coefficient de diffusion D . Il convient donc de mettre au point une méthode permettant d'accéder globalement aux quatre constantes V_m , K_m , e et D .

2) METHODE

a) Utilisation de la réaction d'ordre 1

Si $S_0 \ll \sqrt{K_m}$, la réaction est d'ordre 1, et la courbe donnant la variation de $P(0)$ en fonction de S_0 dans un diagramme bi-logarithmique, est une droite de pente égale à l'unité.

$$\text{Log } P(0) = \text{Log } S_0 + \text{Log} \left(1 - \frac{1}{\text{ch} \lambda e}\right)$$

Pour S_0 fixé, on peut donc estimer l'expression

$$\left(1 - \frac{1}{\text{ch} \lambda e}\right)$$

$$\text{soit} \quad \lambda^2 e^2 = \frac{V_m e^2}{DK_m} = \sigma$$

à condition que σ ne soit pas trop important.

En effet si :

$$\sigma \gg 1 \implies \left(1 - \frac{1}{\text{ch} \lambda e}\right) = \left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\sqrt{\sigma})}\right) \approx 1$$

$$\implies \text{Log} \left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\sqrt{\sigma})}\right) \approx 0$$

Dans ce cas, il conviendra d'abaisser artificiellement la valeur σ de la membrane, en utilisant des inhibiteurs réversibles de type compétitif.

b) Utilisation de la réaction d'ordre 0

Lorsque en particulier $S_0 \gg K_m$ et $V_m e^2 / 2D < S_0$, la réaction est d'ordre 0 ; la courbe donnant la variation de $P(0)$ en fonction de S_0 dans un diagramme bi-logarithmique est un palier de valeur constante.

$$\text{Log } P_0 = \text{Log} \left(\frac{V_m e^2}{2D} \right)$$

La valeur de ce palier permet d'atteindre :

$$\sigma' = \frac{V_m e^2}{2D}$$

En calculant le rapport de σ' sur σ , la valeur de K_m peut être estimée ; en effet

$$\frac{\sigma'}{\sigma} = \frac{V_m e^2}{2D} \times \frac{DK_m}{V_m e^2} = \frac{K_m}{2}$$

c) Détermination de l'épaisseur et du coefficient de diffusion

La détermination de l'épaisseur de la membrane peut

s'effectuer après décollage de la membrane, en utilisant un palmer. Malgré une précision relativement faible, cette mesure permet, à priori ou à posteriori, d'avoir une estimation de l'épaisseur de la membrane, surtout lorsque l'accès à $P(0)$ fait défaut (absence de capteur).

- la détermination du coefficient de diffusion D peut être conduite par différentes méthodes, dont celle développée au sein de notre laboratoire, utilisant des isotopes marqués [R. GUYONNET - Thèse 1978]

Par exemple, le coefficient de diffusion de l'acétylcholine à travers une membrane albumine/aldéhyde glutarique peut être estimé à $\text{pH} = 7,0$:

$$D \approx 1,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Ce coefficient est sensiblement le même pour la diffusion de l'urée à travers une membrane identique.

L'utilisation de l'étude théorique en phase d'évolution peut permettre d'accéder au rapport e^2/D .

L'étude en phase d'évolution, peut être abordée en analyse numérique, en incluant, en plus de l'espace (épaisseur e), le temps. Le système d'équations à résoudre est :

$$\text{IV} \quad \left[\begin{array}{l} \frac{\partial S}{\partial t} - D \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial t} - D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} (5) \\ (6) \end{array}$$

$$\text{avec} \quad \begin{array}{l} t = 0 \quad \forall x \in [0, e[\\ S(0, x) = P(0, x) = 0 \end{array} \quad (7)$$

$$\forall t > 0 \quad \left[\begin{array}{l} S(t, e) = S_0 \\ P(t, e) = 0 \end{array} \right] \quad (8)$$

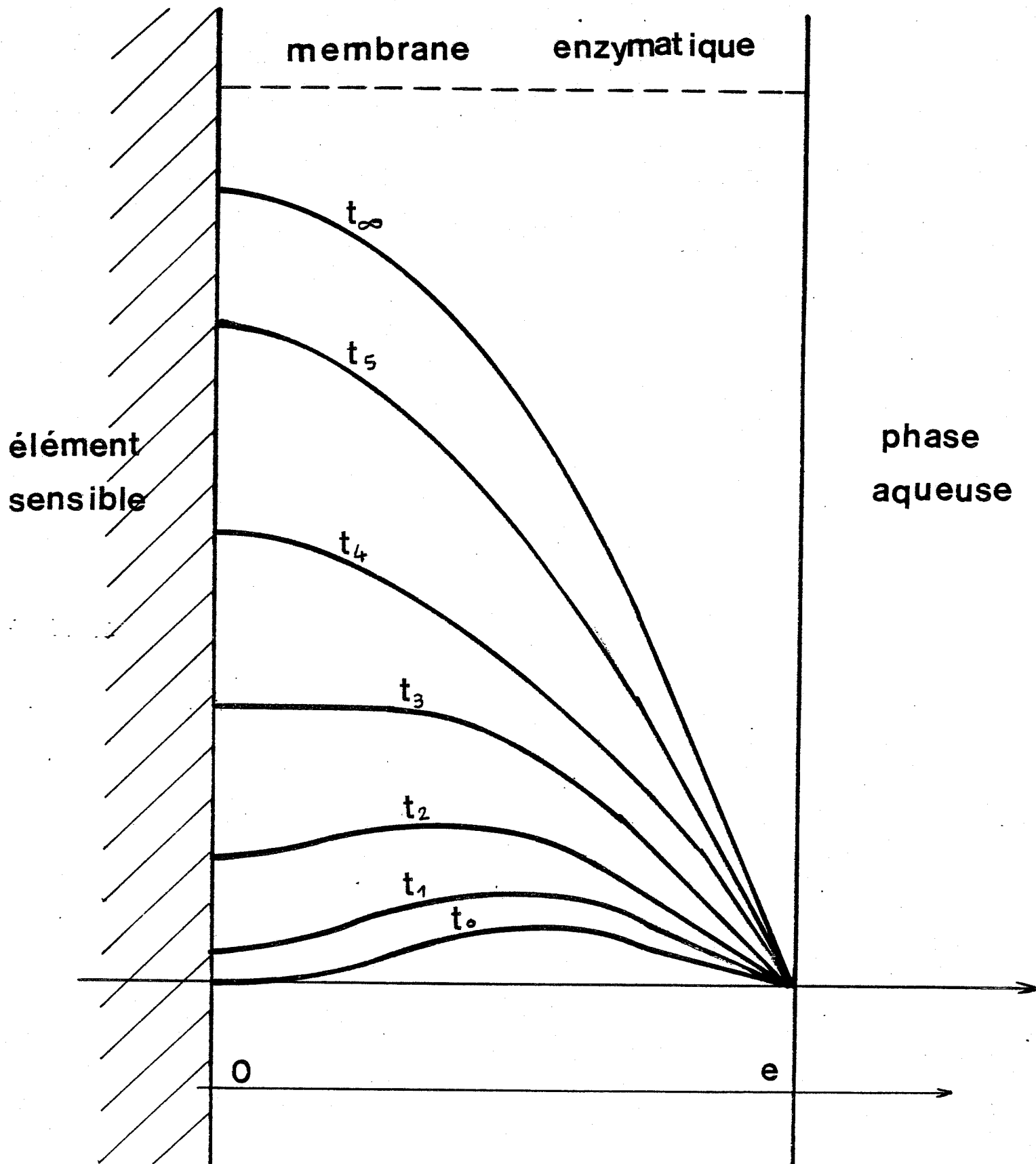


FIGURE 4 - Evolution du profil de $[P]$ à l'intérieur d'une membrane enzymatique.

t_∞ = état stationnaire

La variation du profil de $[P]$ à l'intérieur de la membrane est donnée figure 4.

L'étude de la réaction d'ordre 1 permet d'atteindre σ . La connaissance de σ permet de suivre l'évolution de $[P]$ en fonction du temps en tout point de la membrane ; donc d'accéder au temps t_∞ à partir duquel l'état peut être considéré comme stationnaire. La connaissance de t_∞ (en unités e^2/D) comparé à la valeur expérimentale obtenue, permet d'atteindre le rapport e^2/D .

Si D est connu, e peut être facilement estimé. e^2/D connu, la réaction d'ordre 0, permet d'estimer la valeur de la constante V_m .

Remarque A :

Il est possible de résoudre le système d'équations en utilisant l'analyse de FOURIER, dans le cadre de l'approximation d'ordre 1, σ étant supposé connu préalablement [F. CONRAD - 1980]. Dans ce cas :

$$\frac{P(x, t)}{S_0} = 1 - \frac{ch\lambda x}{ch\lambda e} - 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{n+1} \exp \left(\frac{-\lambda_n^2 Dt}{e^2} \right) \frac{1 + \alpha \lambda_n^2 (1 + \exp \left(\frac{-Vt}{K_m} \right))}{\lambda_n (1 + \alpha \lambda_n^2)} \cos \left(\frac{\lambda_n x}{e} \right)$$

$$\text{avec } \alpha^2 = \frac{DK_m}{V_m e^2} = \frac{1}{\sigma}$$

$$\text{et } \lambda_n = (2n - 1) \pi/2$$

S'il est possible d'accéder très précisément à $P(0, t)$, la méthode proposée [F. CONRAD - 1980] est :

- 1/ à t fixé, on mesure $P(0, t)$
- 2/ l'équation $z = P(0, t)/S_0$ permet de déterminer la valeur z correspondante, par tabulation précise de la fonction

- 3/ le tracé de z en fonction de t , doit faire apparaître une droite de pente D/e^2
- 4/ la connaissance de D , entraîne obligatoirement celle de e donc celle de V_m en utilisant l'approximation d'ordre 0.

Remarque B :

On retrouve les mêmes résultats par d'autres méthodes de détermination des paramètres [F. CONRAD - Publication en cours].

CHAPITRE VI

APPLICATION A LA REALISATION DE CAPTEURS

POUR LE DOSAGE DE SUBSTRATS

CHAPITRE VI

APPLICATION A LA REALISATION DE CAPTEURS
POUR LE DOSAGE DE SUBSTRATSI) PREAMBULE

Nous avons axé nos travaux, quant à la réalisation et la mise au point de capteurs, sur 3 enzymes :

- l'uréase, suite aux travaux de CANH TRAN MINH [1971]
- l'acétylcholinestérase et l'uricase dont l'intérêt tant d'un point de vue médical que scientifique est important.

L'essentiel de nos recherches a surtout porté sur la réalisation d'électrodes à uréase et à acétylcholinestérase, fiables, précises et ayant une longévité importante. Il convenait de s'assurer des qualités de ces capteurs avant d'aborder une étude sur les phénomènes d'inhibition.

Nous avons mené ces travaux, d'un point de vue technique, en association et en complément de l'étude théorique déjà réalisée au cours du chapitre précédent.

II) ELECTRODE A UREASE1) CONDITIONS DE BASE

- capteur utilisé :

- . électrode à PCO_2 Radiometer E 5036
- ou . électrode à NH_4^+ type Philips plate IS 561
- ou . électrode à NH_4^+ Beckmann ronde référence 39137

- substrat : l'urée, qui sous l'action de l'uréase, est décomposée en CO_2 et NH_3 selon la réaction :

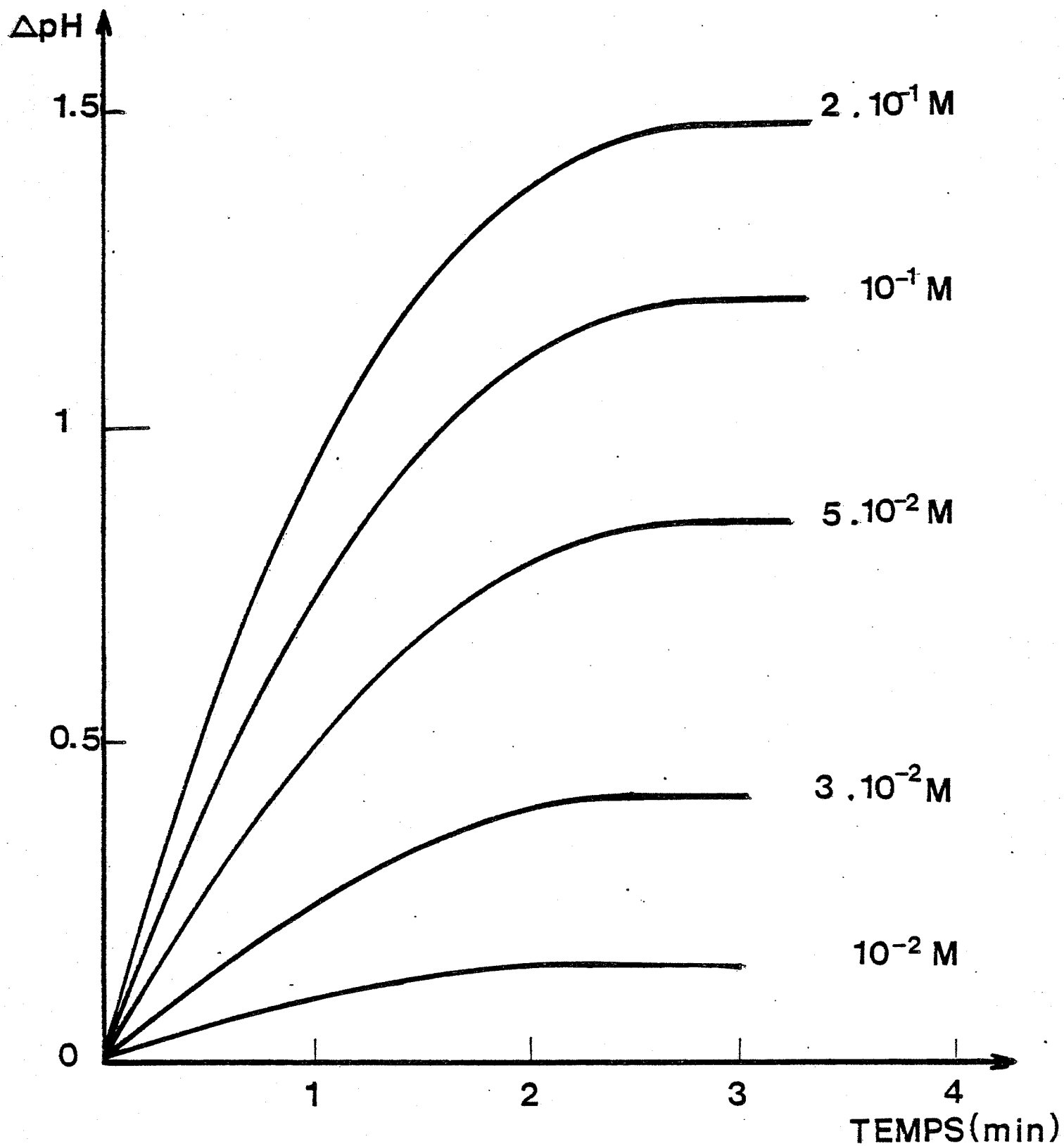
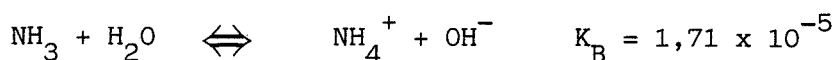
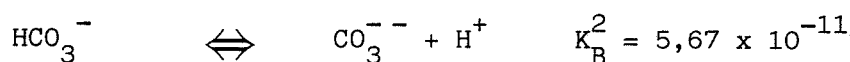
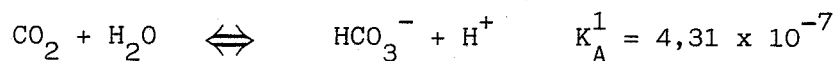
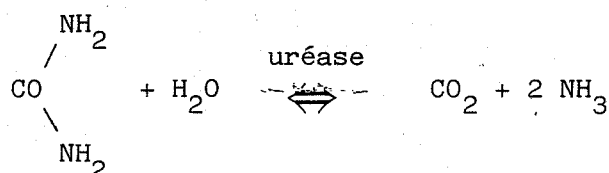


FIGURE 1 - Evolution de la variation du pH au niveau de l'interface membrane/élément sensible en fonction du temps, pour différentes concentrations en urée
conditions expérimentales : tampon phosphate pH = 7,0, concentration 0,1M.



- solution : pour toutes nos expériences, nous avons utilisé une solution de monohydrogéné- phosphate (Na_2HPO_4 - 0,25 M) et de dihydrogéné phosphate de sodium (NaH_2PO_4 - 0,25 M) dite "tampon phosphate", à pH = 7,0 et à température ambiante.

Le choix de la force ionique du tampon phosphate est très important dans la mesure où les conditions expérimentales doivent être très voisines des hypothèses mathématiques du modèle développé au chapitre précédent.

Une électrode à pH plate Radiometer est recouverte sur sa surface active d'une membrane à uréase immobilisée. Nous la plongeons successivement dans différents tampons phosphate, pH = 7,0 de concentrations variant de 0,1 M à 0,5 M, et nous notons la variation de pH sur la face interne de la membrane pour différentes concentrations de substrat S_0 dans la phase aqueuse.

A partir des résultats exposés dans les figure 1 et figure 2, on remarque que :

- un état stationnaire s'établit rapidement au bout de 2 à 3 minutes
- la variation du pH sur la face interne de la membrane n'est pas négligeable. Aussi, dans la mesure où nous souhaitons que les constantes Michaeliennes V_m et K_m ne varient pas dans des proportions significatives au sein de la membrane à uréase, il nous appartient de limiter les variations de pH en choisissant

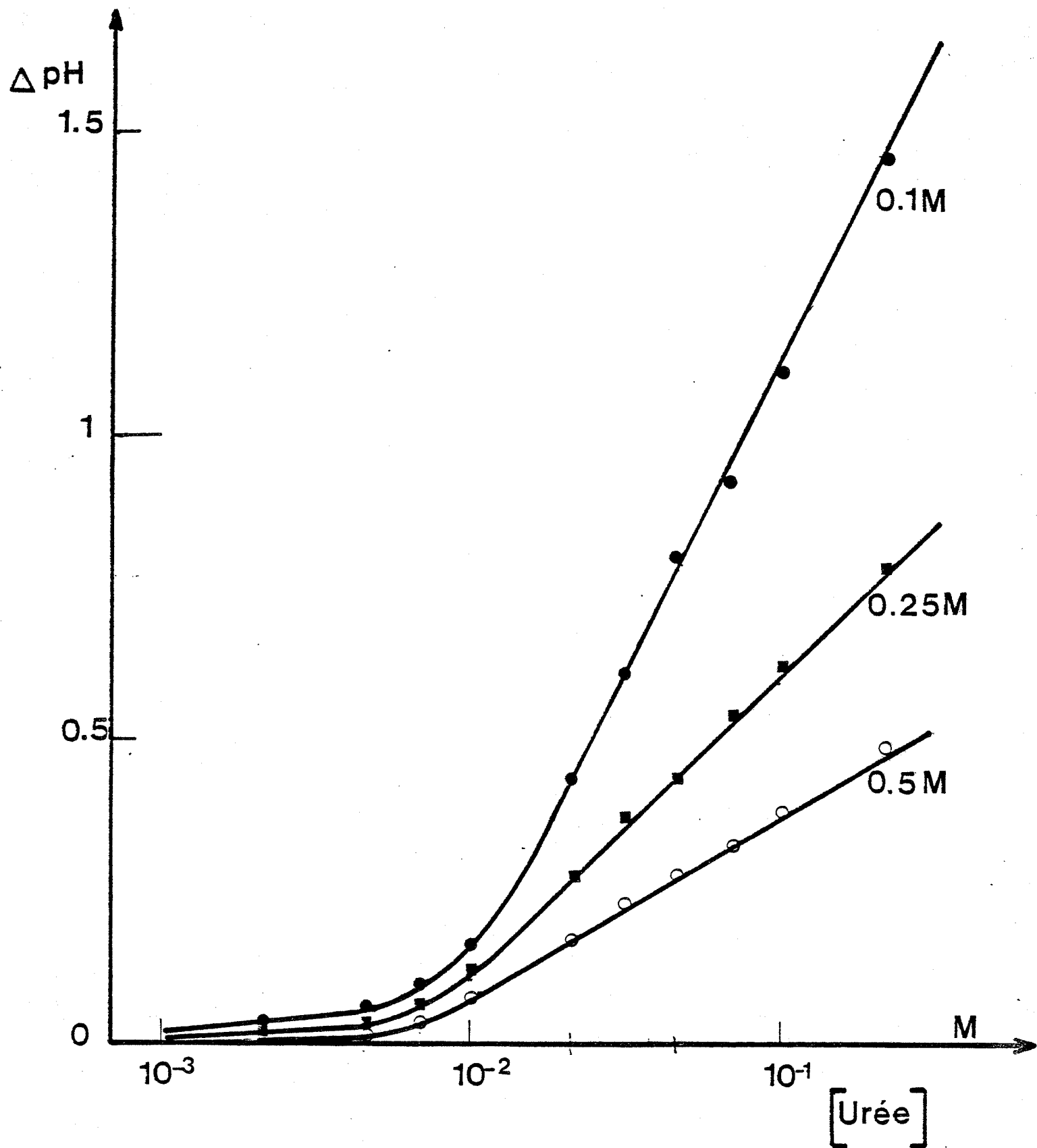


FIGURE 2 - Variation du pH au niveau de l'interface membrane/élément sensible en fonction de la concentration en urée dans la phase aqueuse pour différentes concentrations de tampon phosphate pH = 7,0.

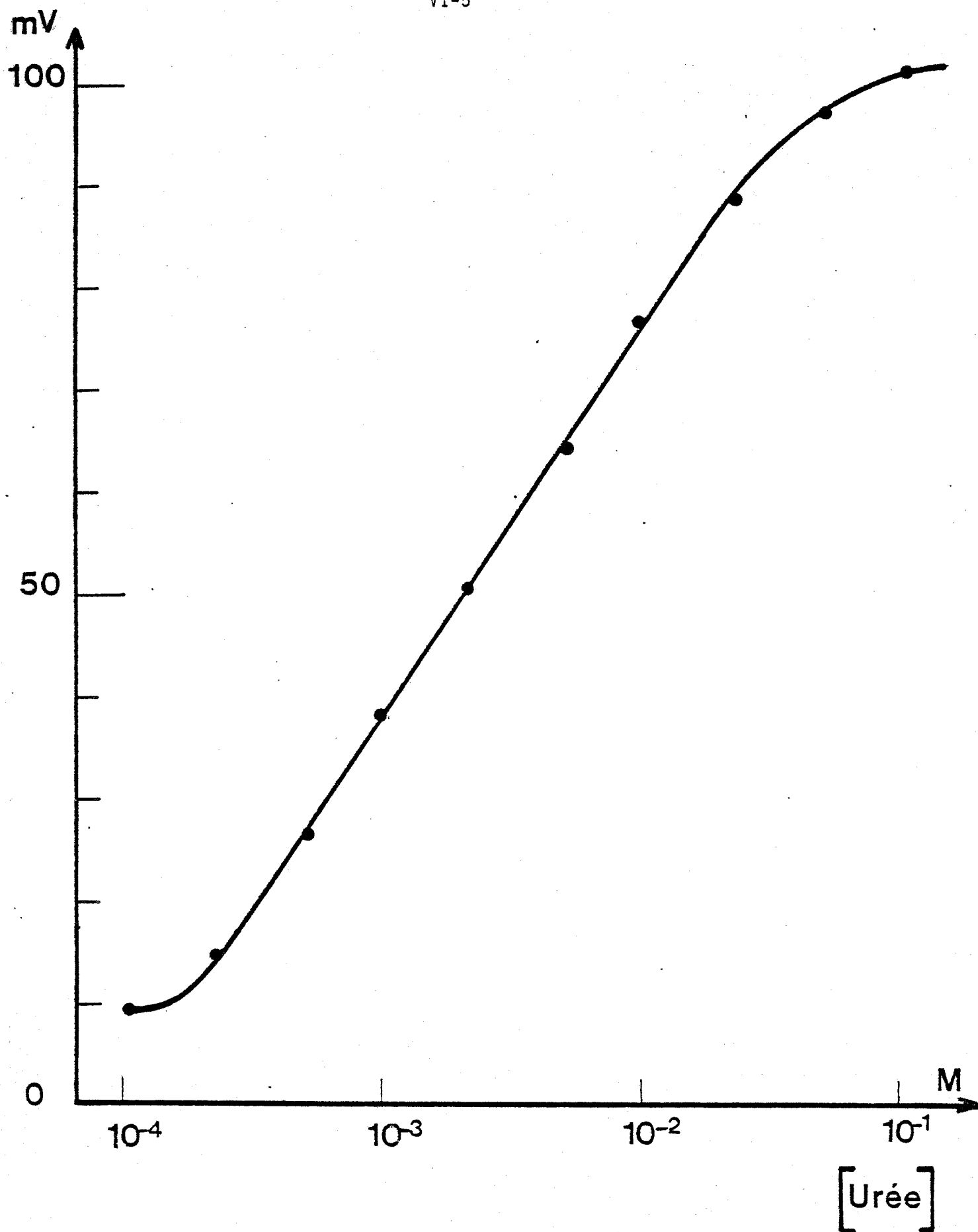


FIGURE 3 - Réponse d'une électrode à P_{CO_2} à uréase immobilisée en fonction de la concentration en urée dans la phase aqueuse -
Conditions expérimentales : tampon phosphate pH = 7,0, concentration = 0,25 M, température 25°C

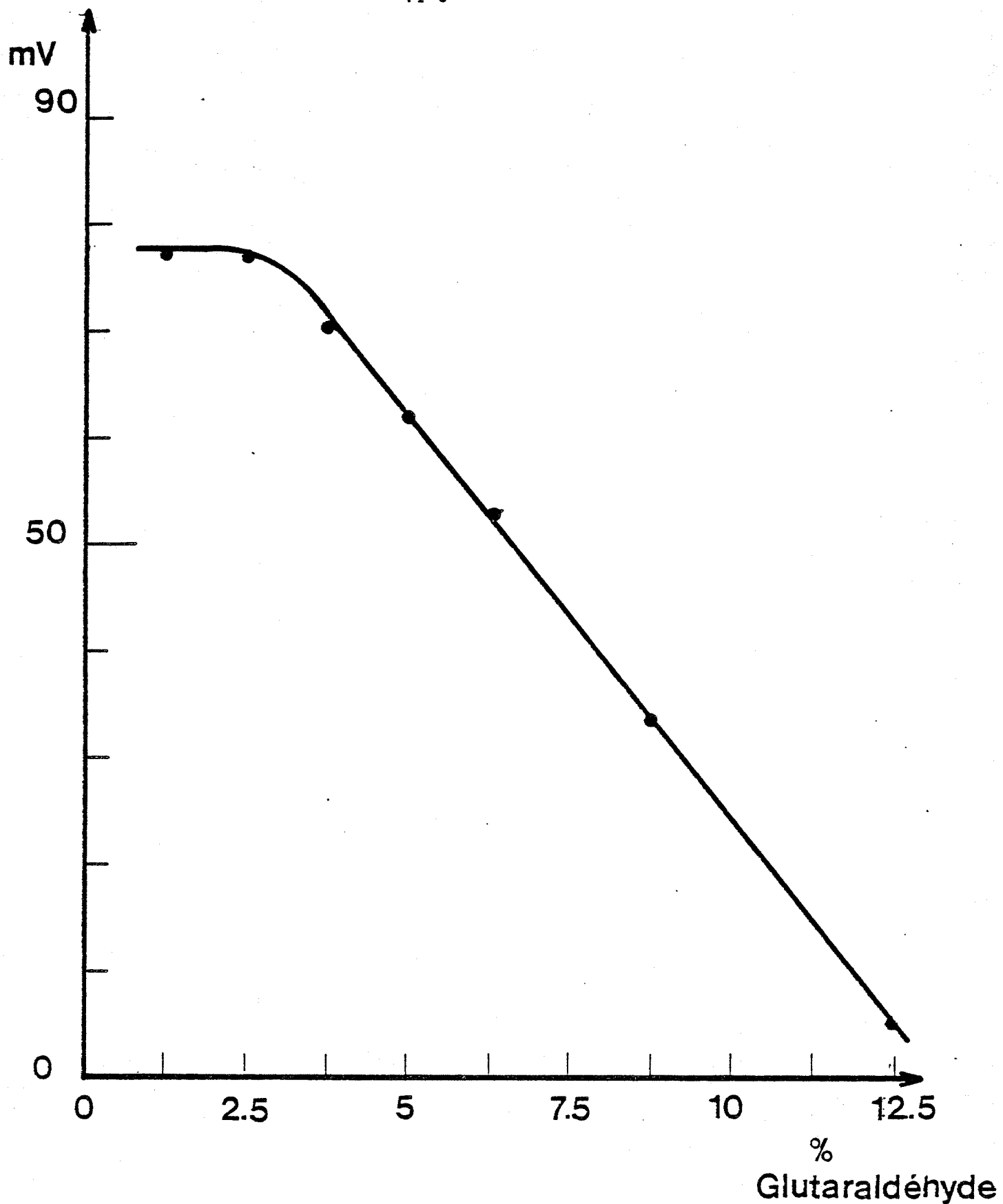


FIGURE 4 - Evolution de la réponse d'une électrode à uréase immobilisée en fonction de la quantité d'agent pontant utilisé pour la fabrication de la membrane.

Conditions expérimentales : 10 μ l d'albumine humaine-5 unités d'uréase
 10 minutes : temps de réticulation - tampon phosphate pH = 7,0
 0,25 M température 25°C [urée] = 10^{-2} M.

un tampon phosphate de concentration supérieure ou égale à 0,25 M, et en limitant l'étude de la réponse du capteur à des concentrations en substrat inférieures à $3-5 \times 10^{-2}$ M.

2) COURBE DE REPONSE

La courbe de réponse s'obtient en portant en ordonnée la réponse en millivolts en fonction du logarithme de la concentration en urée dans la phase aqueuse (figure 3).

La courbe de réponse présente une partie linéaire pour des concentrations en substrat comprises entre 3×10^{-3} M et 10^{-2} M ; au delà on obtient un palier.

Le temps de réponse permettant d'atteindre l'état quasi-stationnaire est de l'ordre de 2 à 3 minutes environ.

3) POUVOIR DENATURANT DE L'AGENT PONTANT

Plusieurs électrodes à uréase immobilisée sont fabriquées dans les conditions suivantes : concentration en enzyme, quantité d'albumine humaine, et temps de réticulation identiques. Par contre la quantité d'aldéhyde glutarique rajoutée varie. On compare la réponse de chaque électrode ainsi fabriquée en la plongeant dans une solution d'urée 10^{-2} M identique, tampon phosphate pH = 7,0, 0,25 M, température 25°C.

La figure 4 met en évidence la diminution de la réponse lorsque la quantité d'aldéhyde glutarique augmente. L'aldéhyde glutarique a donc un pouvoir dénaturant important sur l'uréase.

4) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME ACTIVE IMMOBILISEE

Plusieurs électrodes à uréase immobilisée sont mises au point en ne faisant varier qu'un seul paramètre de fabrication : la concentration en enzyme dissoute dans l'albumine humaine, tous les autres paramètres restant identiques.

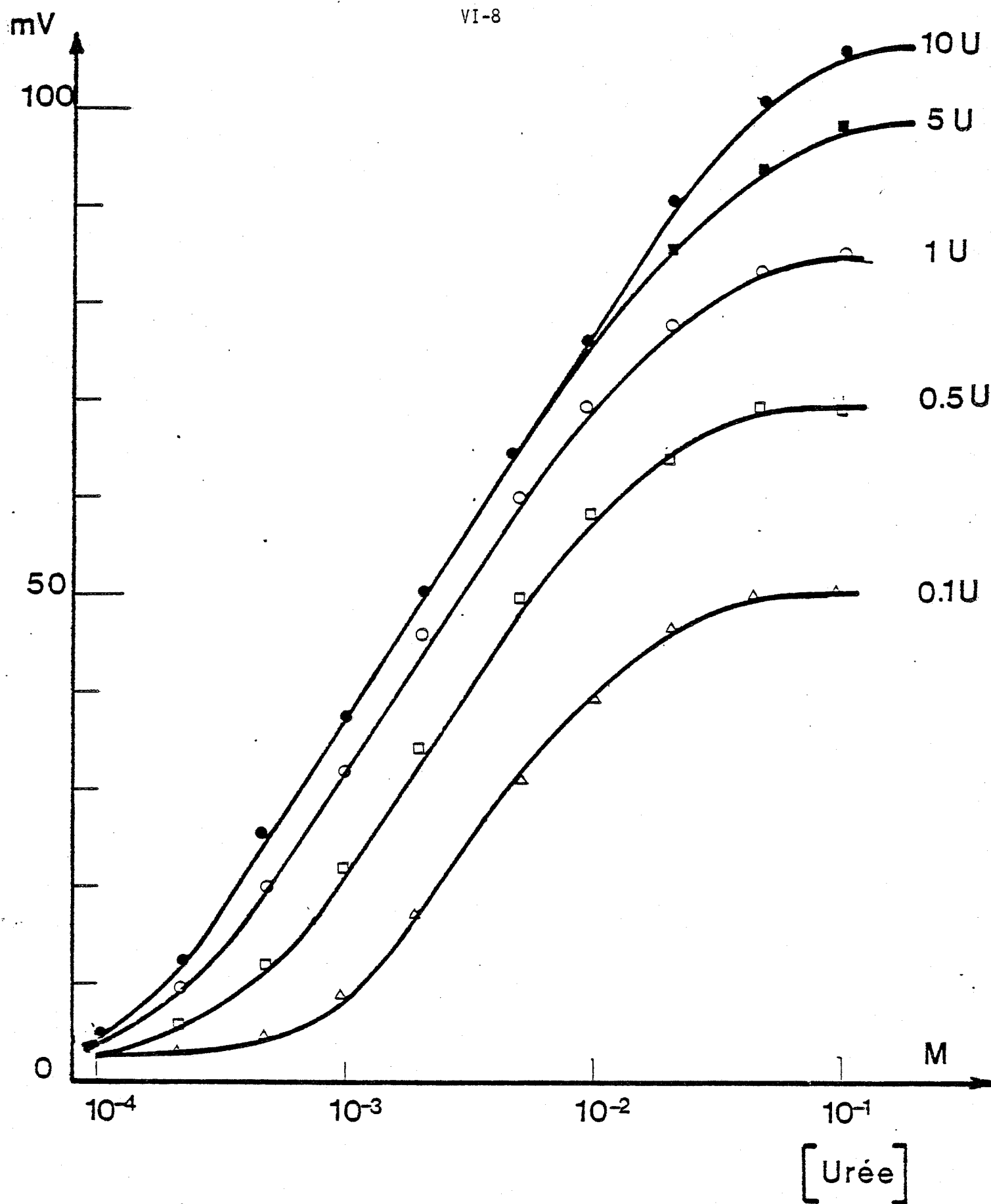


FIGURE 5 - Influence de la quantité d'uréase immobilisée sur la réponse de l'électrode à uréase vis-à-vis de l'urée.
 Conditions expérimentales pour la fabrication d'une électrode :
 10 μ l d'albumine humaine
 1 μ l d'aldéhyde glutarique
 10 minutes de temps de réticulation - tampon phosphate pH = 7,0
 0,25 M température 25°C

La figure 5 met en évidence les résultats obtenus, trois remarques s'imposent :

- au delà d'une quantité minimale d'enzyme dissoute, les parties linéaires des courbes de réponse sont sensiblement identiques ; c'est la "droite limite" dont l'existence a été mise en évidence lors de l'étude mathématique. Tout le substrat est consommé avant d'avoir atteint l'interface interne ; la concentration de produit formé à l'interface interne est alors égale à la concentration en substrat dans la phase aqueuse.

- la partie linéaire de la courbe de réponse est d'autant plus "longue" que la quantité d'enzyme dissoute dans l'albumine humaine est élevée.

- le palier de la courbe de réponse est d'autant plus haut que la quantité d'enzyme dissoute est élevée.

Ces deux derniers résultats sont à rapprocher de ceux obtenus lors de l'étude théorique (figure 1). La concordance des résultats est très intéressante.

5) DUREE DE VIE

Par définition, la durée de vie d'une membrane enzymatique est le temps pendant lequel la concentration de produit formé à l'interface interne membrane enzymatique/électrode reste sensiblement constante. Il convient d'appliquer cette définition avec précaution en tenant compte de l'activité de la membrane. Deux cas peuvent se présenter.

1^{er} cas : La partie linéaire de la courbe de réponse de l'électrode ne se confond pas avec la "droite limite". Dans ce cas, les profils de concentration de S et P au sein de la membrane sont représentés figure 6, en trait plein. Toute perte d'activité au sein de la membrane va entraîner une modification des profils de concentration de S et de P, ce qui est représenté en traits pointillés figure 6. En $x = 0$, (interface interne membrane enzymatique/électrode), la concentration de produit formé chute, ce qui est détectable immédiatement.

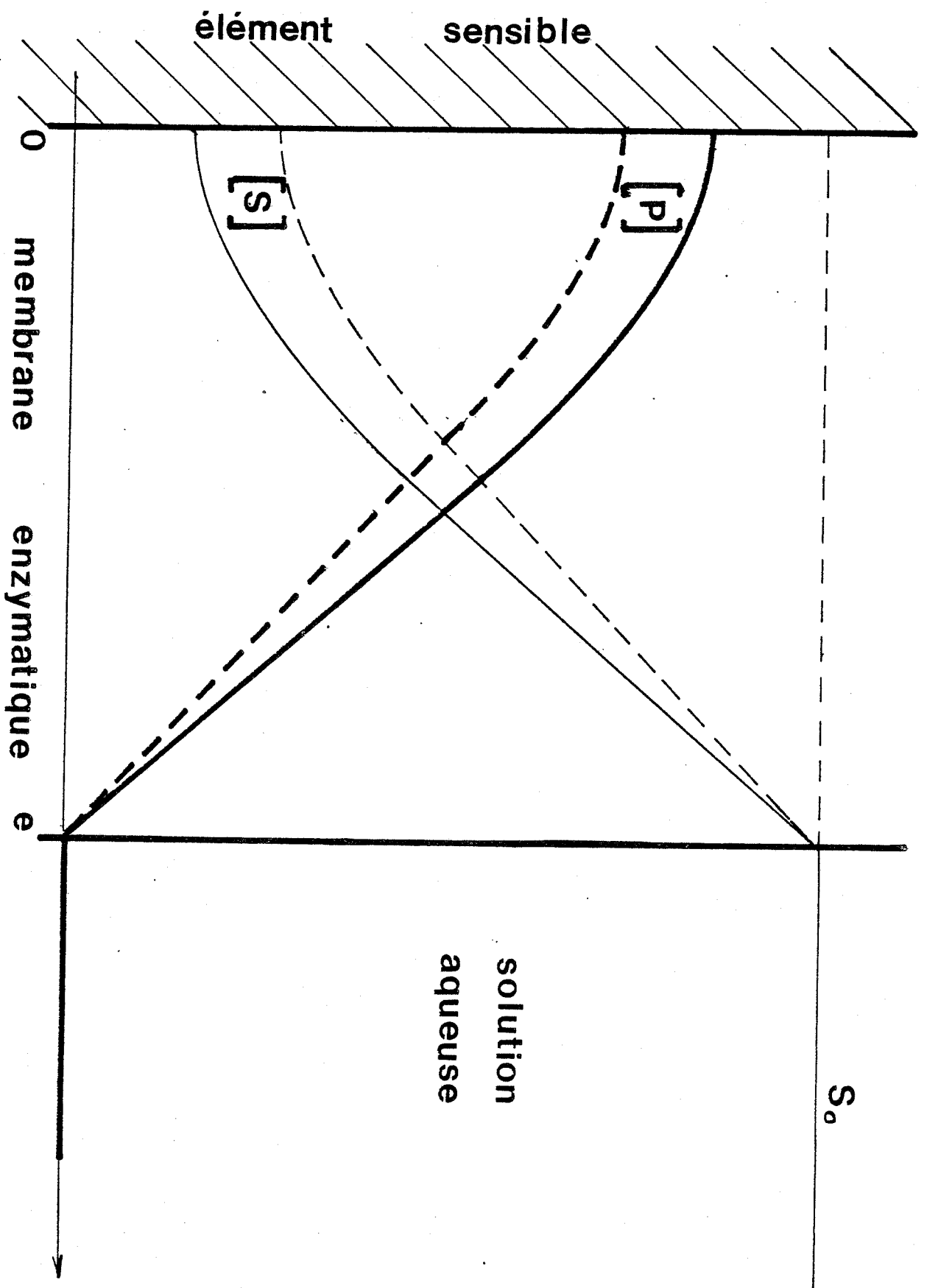


FIGURE 6 - Mise en évidence de la modification des profils de $[S]$ et $[P]$ au sein d'une membrane enzymatique "peu active" lors d'une perte d'activité enzymatique.

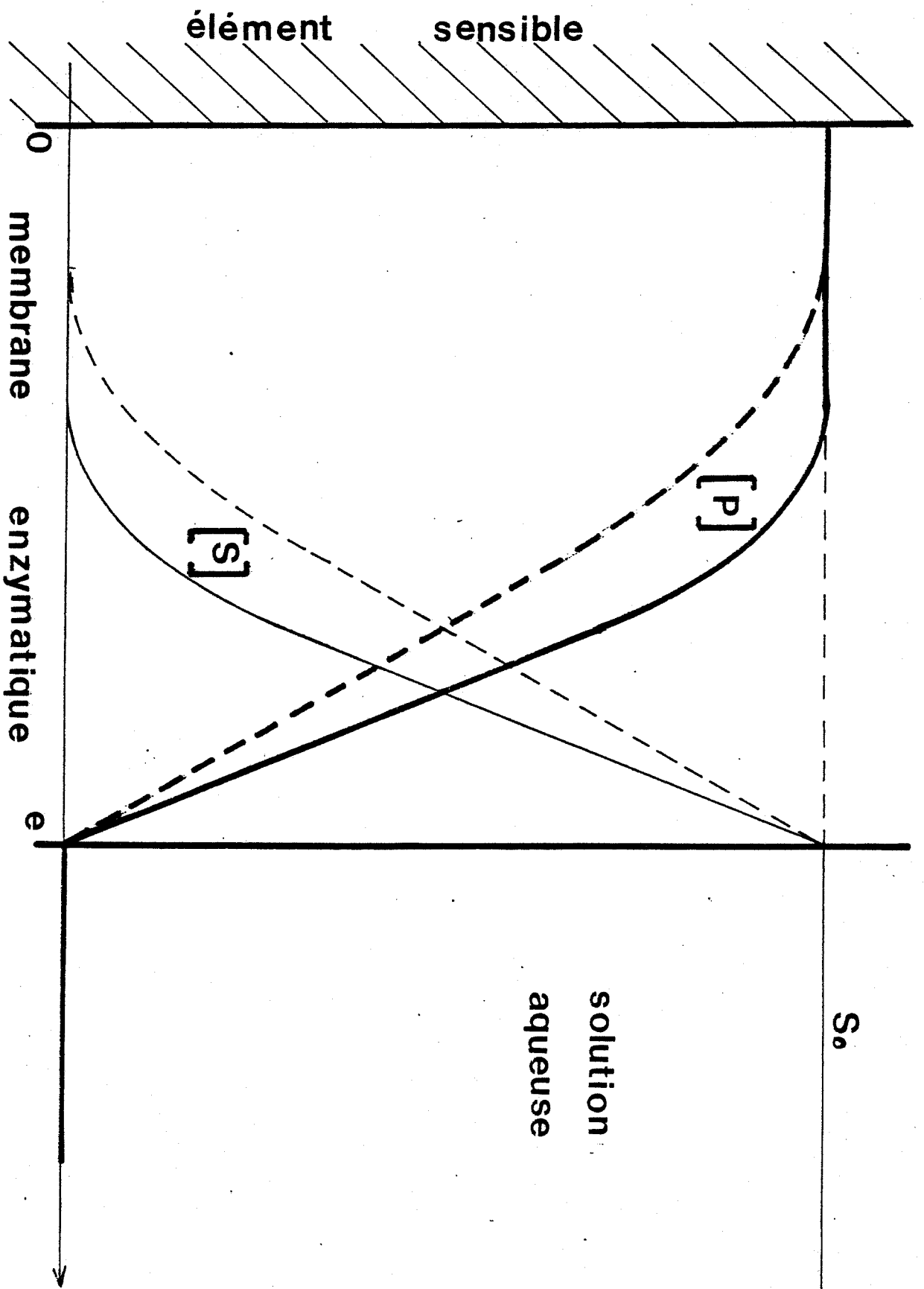


FIGURE 7 - Mise en évidence de la modification des profils de $[S]$ et $[P]$ au sein d'une membrane enzymatique "très active" lors d'une perte d'activité enzymatique.

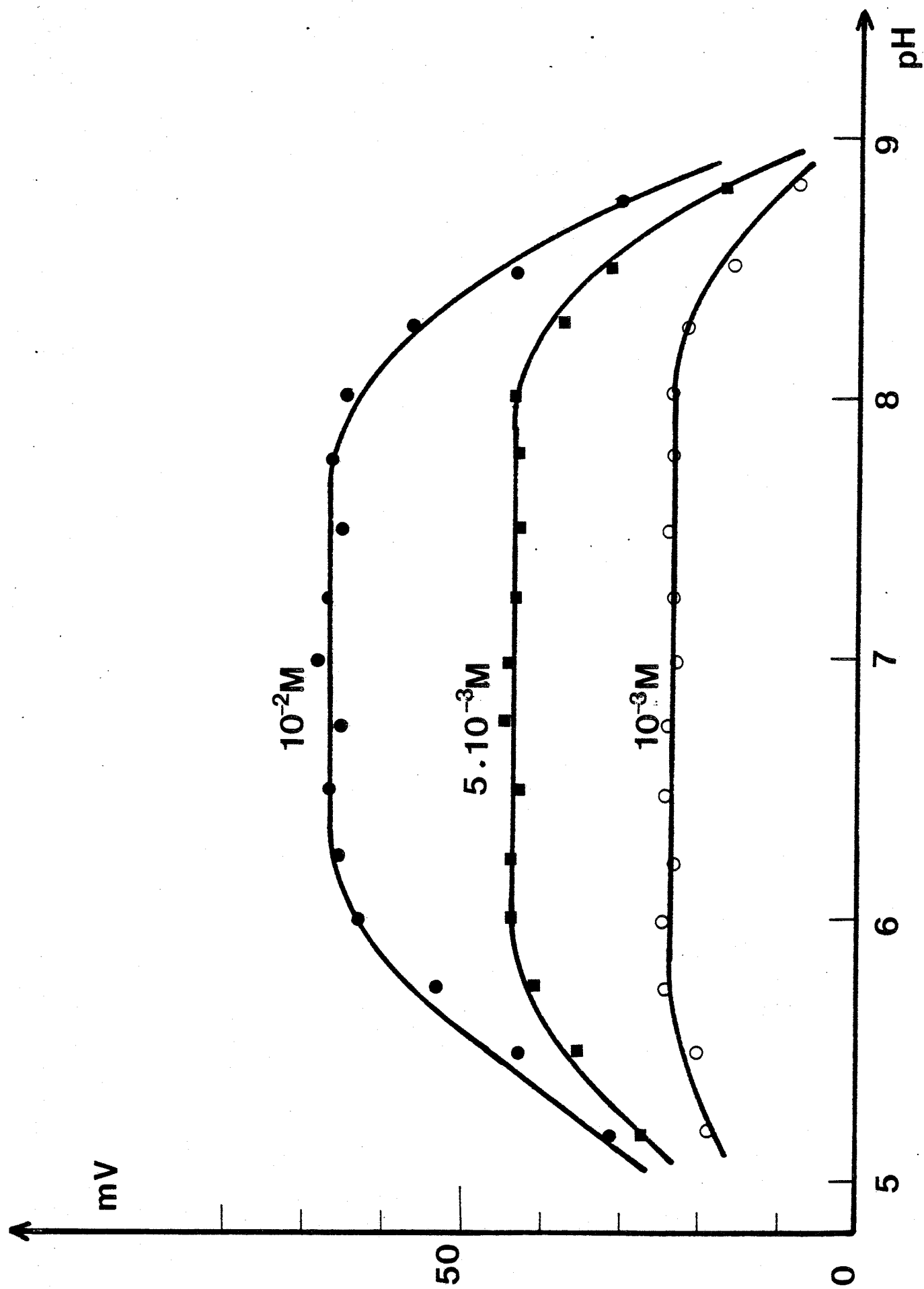


FIGURE 8 - Réponse d'une électrode à uréase à activité élevée, en fonction du pH, pour 3 concentrations différentes d'urée dans la phase aqueuse.

2^e cas : La partie linéaire de la courbe de réponse de l'électrode est la "droite limite". La figure 7 met en évidence les profils de [S] et [P] au sein de la membrane enzymatique avant et après la modification d'activité [traits — et traits --- respectivement]. Dans ce cas, en $x = 0$ interface membrane enzymatique/électrode, aucune modification n'est détectée, malgré la perte évidente d'activité au sein de la membrane. Cette difficulté pourra être contournée en utilisant des inhibiteurs réversibles immédiatement (par exemple les ions fluorures pour l'uréase) et la méthode du pourcentage d'inhibition (voir chapitre VIII et IX).

La durée de vie moyenne d'une membrane enzymatique est supérieure à un mois. Dans la plupart des cas, les essais réalisés ont dû être interrompus, non par perte importante d'activité, mais suite au décollement de la membrane enzymatique de la surface active de l'électrode.

6) INFLUENCE DU pH

En phase homogène, l'étude de l'activité de l'uréase présente un maximum au voisinage de $\text{pH} = 7,0$. Par contre, lorsque l'enzyme est réticulée au sein de la membrane, il convient d'être très prudent quant aux conclusions tirées des résultats, et ceci pour deux raisons :

- le pH agit à la fois sur les constantes V_m et K_m , mais l'action sur la constante V_m est plus importante [D. VALLIN Thèse en préparation].
- nous n'avons accès, du point de vue expérimental, qu'à la concentration du produit formé à l'interface membrane enzymatique/électrode. Les remarques formulées lors de l'étude sur la durée de vie de la membrane enzymatique sont extensibles à toute étude du pH. Si nous fabriquons une membrane enzymatique très active, la variation de pH n'affectera pas la réponse de l'électrode, d'où l'obtention d'un palier de réponse ; palier d'autant plus long que la concentration en substrat dans la phase aqueuse est faible, et que la droite de réponse de l'électrode est importante (figure 8).

Par contre, si nous fabriquons une membrane enzymatique peu active, le maximum de l'activité se situe au voisinage de $\text{pH} = 7,0$. Il sem-

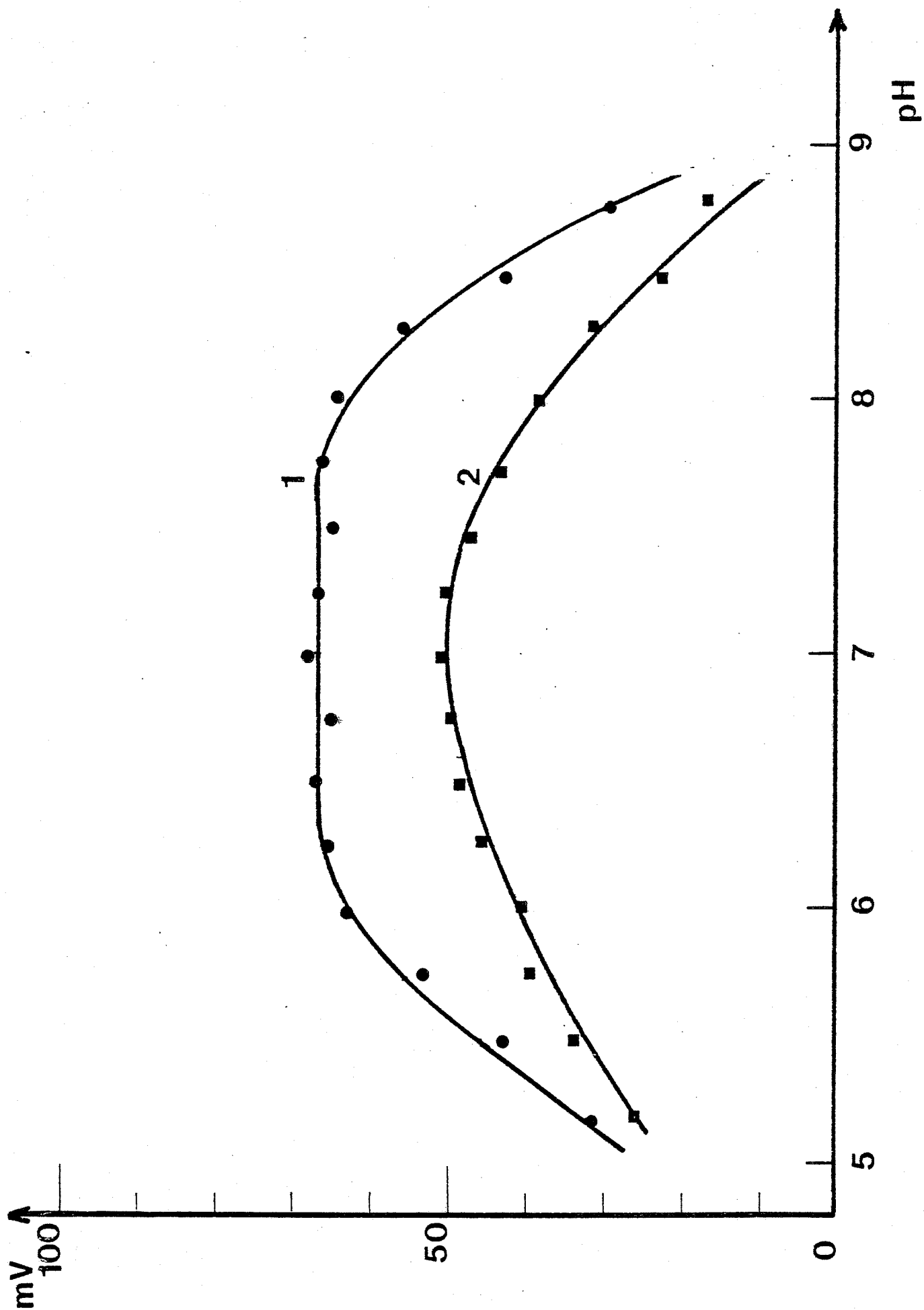


FIGURE 9 - Réponse comparative de deux électrodes à uréase, en fonction du pH de la phase aqueuse.
 (1) cas d'une membrane à activité élevée
 (2) cas d'une membrane à faible activité. pour $[urée] = 10^{-2}$ M.

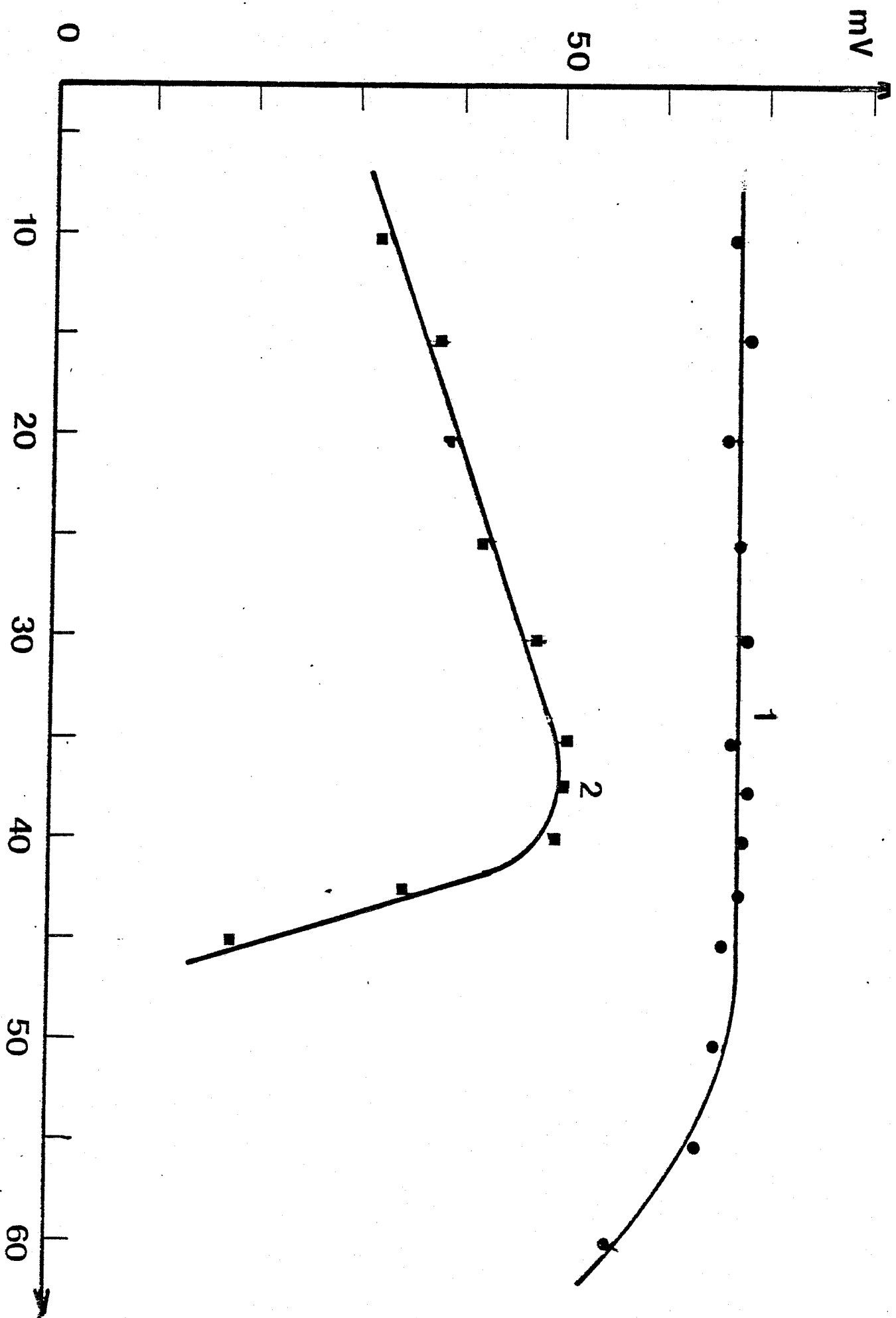


FIGURE 10 - Influence de l'activité sur la réponse de l'électrode en fonction de la température
 (1) membrane à activité élevée - (2) membrane à faible activité
 pour [urée] = 10^{-2} M.

blerait que l'enzyme soit moins pH-dépendante (figure 9).

7) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

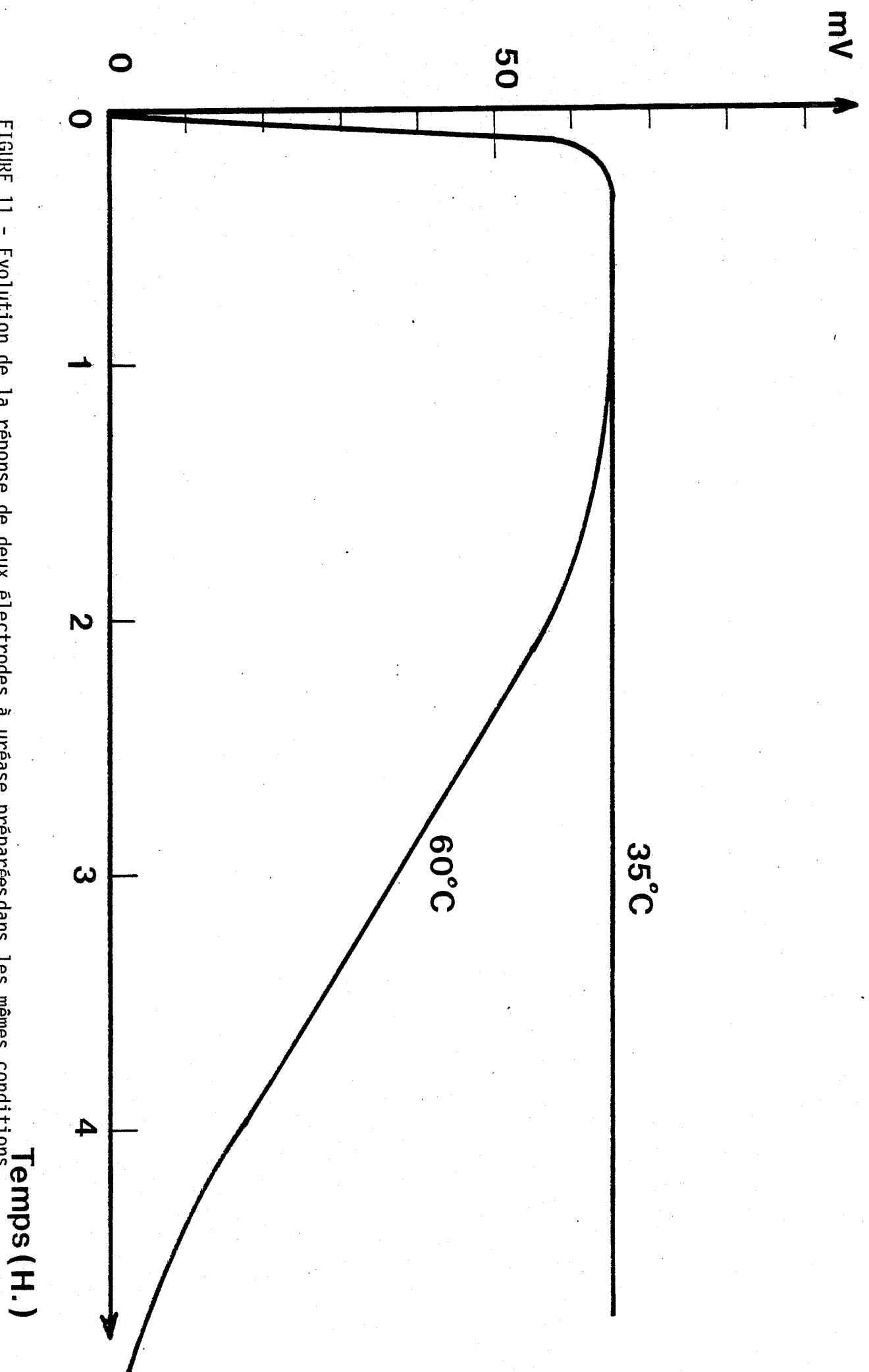
En phase homogène avec un tampon phosphate pH = 7,0; 0,25M, l'uréase présente un maximum d'activité au voisinage de 37°C.

Avec une membrane à uréase faiblement active, où toute modification d'activité est immédiatement détectée, le maximum d'activité semble bien se situer au voisinage de 37°C. Au delà de 40°C il y a abaissement de l'activité enzymatique correspondant au phénomène de dénaturation.

Par contre, avec une membrane fortement active, il convient d'être très prudent quant aux conclusions tirées de l'expérience. En effet, en travaillant avec une durée d'expérimentation courte (10 à 15 minutes environ), la réponse de l'électrode est restée stable jusqu'à 65°C (figure 10). Une étude plus complète, utilisant les phénomènes d'inhibition par les ions fluorures [chapitre VIII et IX] montre que jusqu'à 40°C environ, il n'y a pas dénaturation de l'uréase. Au delà, l'enzyme est progressivement dénaturée. Nous pouvons mettre ce résultat en évidence en plongeant 2 électrodes enzymatiques sensiblement identiques dans deux solutions d'urée de même concentration, l'une à 35°C, l'autre à 60°C, et en suivant l'évolution de leurs réponses en fonction du temps (figure 11). Au bout de 5 heures, la membrane ayant travaillé à 60°C, est totalement inactive.

8) CONCLUSION

L'étude réalisée précédemment met en évidence la possibilité de fabriquer une électrode à uréase fiable et reproductible, mais il convient de prendre des précautions quant aux conclusions des résultats expérimentaux surtout lorsque la membrane enzymatique est active.



Temps (H.)

FIGURE 11 - Evolution de la réponse de deux électrodes à uréase préparées dans les mêmes conditions plongeant dans deux solutions d'urée de concentration $10^{-2}M$, mais travaillant à des températures différentes.

III) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE

1) PRELIMINAIRE

Au vu du rôle considérable que joue l'acétylcholine dans la transmission de l'influx nerveux, la réalisation d'un capteur à acétylcholinestérase est intéressante, pour le dosage en continu de l'acétylcholine [R. GUYONNET - J. BEAUX - 1978]. Sa mise en oeuvre, tant in-vivo, que in-vitro ouvre la voie aux capteurs des neurotransmetteurs.

Nous avons utilisé 2 types d'électrodes :

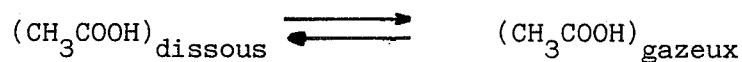
- une électrode à acide acétique
- une électrode à pH.

2) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE UTILISANT UNE ELECTRODE A ACIDE ACETIQUE

L'acétylcholinestérase décompose l'acétylcholine en acide acétique et choline. Nous avons mis au point un capteur permettant le dosage de l'acide acétique, produit de la réaction.

a) Capteur à acide acétique

L'acide acétique est un produit légèrement volatil.



Nous avons utilisé une électrode type PCO_2 RADIOMETER, en remplaçant la membrane silicone par une membrane perméable à l'acide acétique gazeux en modifiant la solution interne de remplissage.

Plusieurs essais, réalisés avec diverses membranes, ont montré que les meilleurs résultats ont été obtenus avec une membrane MILLIPORE LCWP 14200, de pores = 10μ . Le liquide de remplissage interne retenu est un mélange de Na^+ , HCO_3^- concentration $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ et Na^+Cl^- concentration 10^{-2} M .

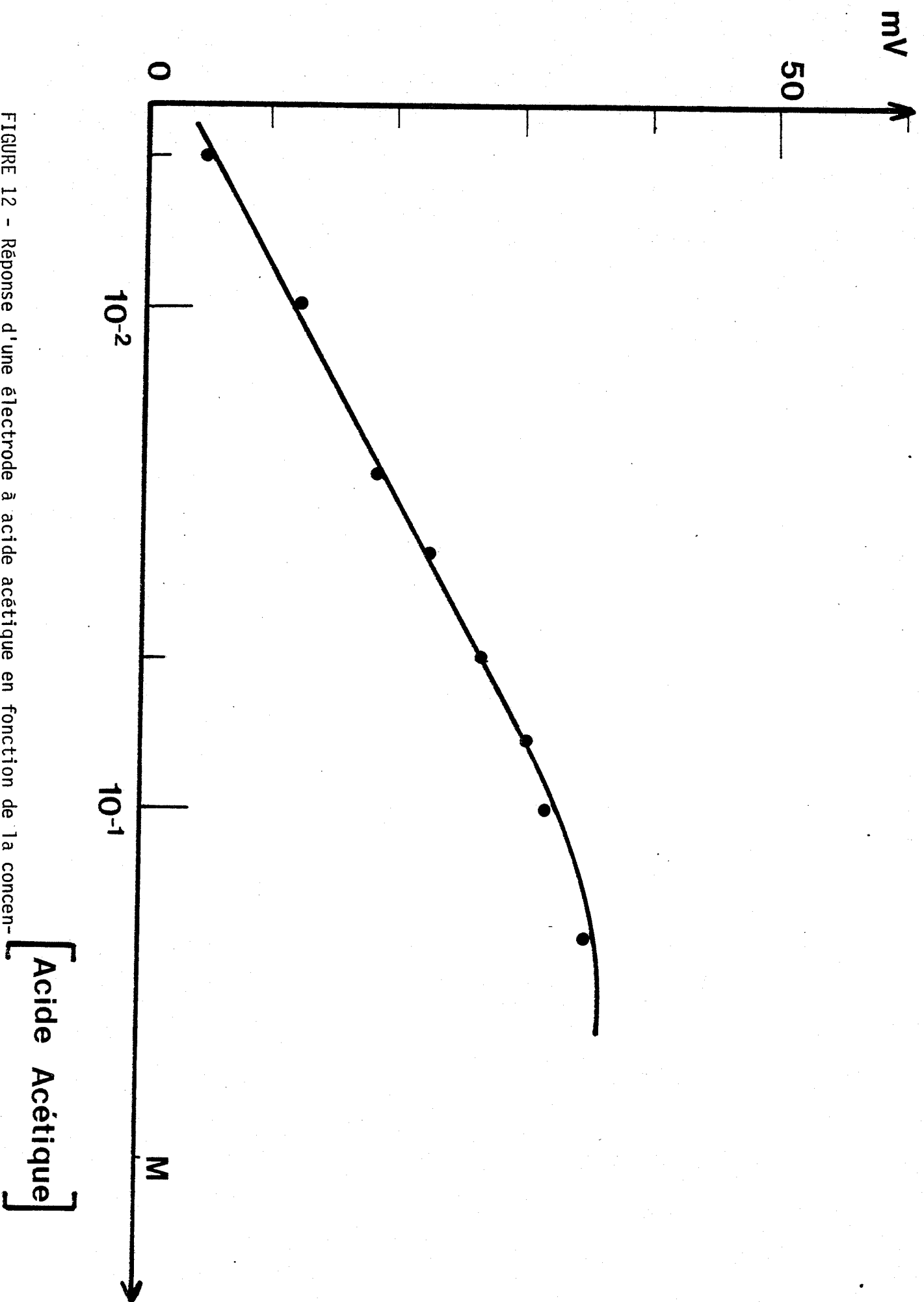


FIGURE 12 - Réponse d'une électrode à acide acétique en fonction de la concentration en acide acétique.

La courbe de réponse de l'électrode en fonction de la concentration en acide acétique dans la phase aqueuse, figure 12, montre que celle-ci admet une partie linéaire de pente relativement faible. Le temps de réponse permettant d'atteindre l'état stationnaire est long : environ 30 minutes.

b) Dosage de l'acétylcholine

Nous avons repris l'électrode mise au point précédemment, et recouvert la membrane MILLIPORE avec une membrane très fortement active (100 Unités d'acétylcholinestérase dissoutes par µlitre d'albumine humaine) l'ensemble plonge dans une solution phosphate pH = 7,0, concentration 0,25 M.

La figure 13 donne la réponse de l'électrode en fonction du temps pour différentes concentrations en acétylcholine dans la phase aqueuse.

Le seuil de détection est élevé ($\geq 10^{-2}$ M acétylcholine). Le temps mis pour atteindre l'état stationnaire est long, et l'amplitude des réponses est trop faible pour que nous puissions, malgré une bonne reproductibilité, utiliser une telle électrode pour la suite de nos travaux.

3) ELECTRODE A ACETYLCHOLINESTERASE UTILISANT UNE ELECTRODE A pH

La détermination directe de la concentration d'acide acétique formé à l'interface membrane enzymatique/capteur est délicate. Le capteur réalisé a peu d'utilisation pratique. La mesure indirecte au moyen d'une électrode pH nous a semblé tout à fait possible.

a) Mise au point de l'électrode

- Nous avons porté notre choix sur une électrode pH plate RADIOMETER, dite "à fromage", pour 2 raisons :

- . facilité de fabrication de la membrane
- . meilleure régularité de l'épaisseur de la membrane.

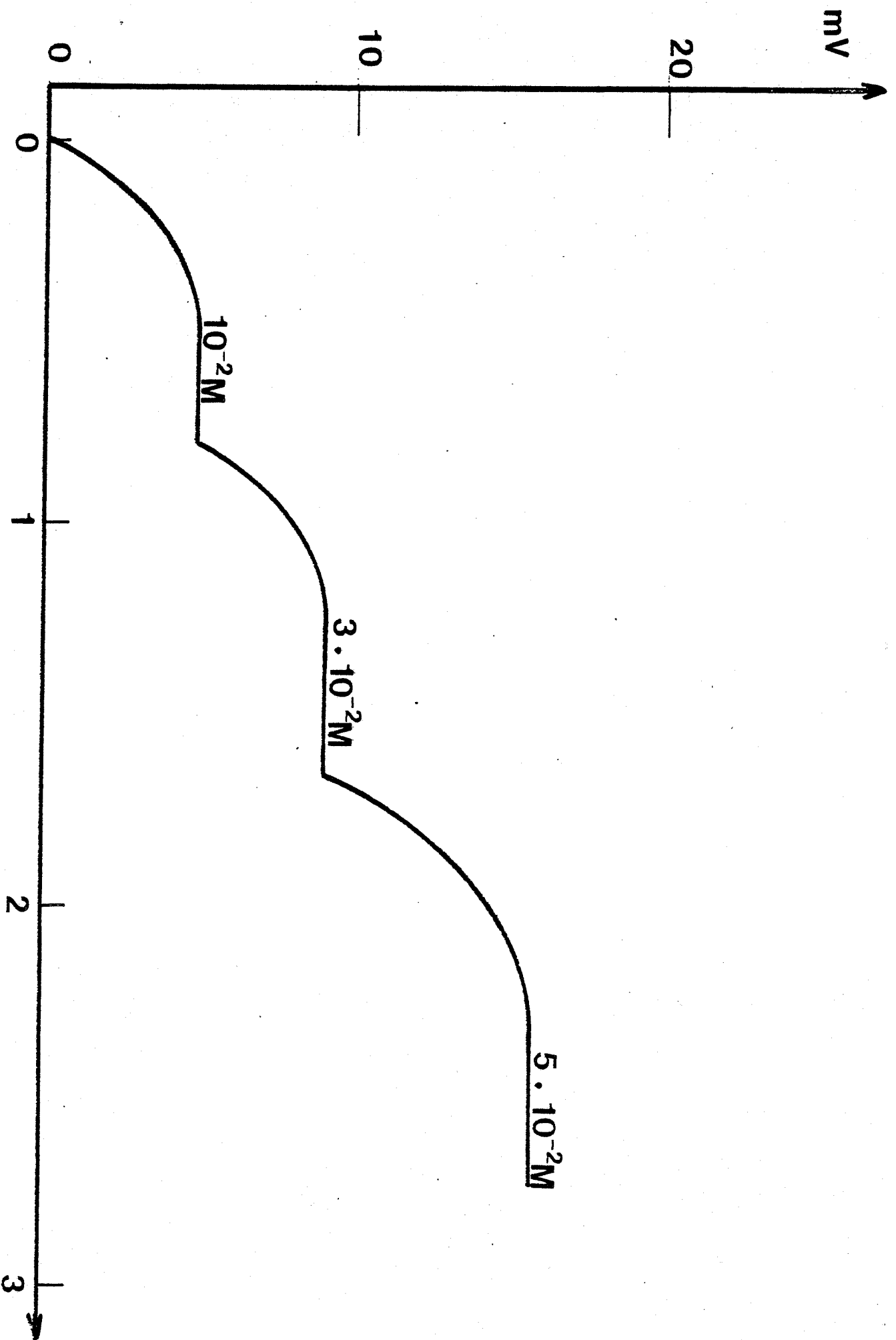


FIGURE 13 - Réponse d'un capteur à acétylcholinestérase utilisant une électrode à acide acétique pour différentes concentrations en acétylcholine dans la phase aqueuse.

- La membrane enzymatique est obtenue en mélangeant 20 μ litres du mélange albumine humaine-acétylcholinestérase avec 15 μ litres d'une solution d'aldéhyde glutarique à 2,5%, pendant un temps de réticulation assez court (5 minutes environ).

- Afin de détecter les variations de pH dues à la production d'acide acétique, le milieu utilisé est un tampon phosphate faiblement concentré 0,01 M à pH = 8,0 et à température ambiante (figure 14).

b) Réponse de l'électrode

Nous avons suivi l'évolution du pH, à la fois sur la face interne de la membrane enzymatique et au sein de la phase aqueuse au moyen d'une deuxième électrode à pH (figure 15).

L'état stationnaire s'obtient au bout de 3 à 4 minutes environ. D'autre part, sur une telle durée, le milieu extérieur n'est pas notablement perturbé par la réaction se déroulant au sein de la membrane à acétylcholinestérase. Par contre, sur la face interne de la membrane, l'élévation de pH est importante et peut atteindre plusieurs unités pH.

c) Courbe de réponse de l'électrode

Si nous représentons la variation de pH en fonction du logarithme de la concentration en acétylcholine, la courbe (figure 16) obtenue, présente une partie linéaire comprise entre 10^{-4} M et 10^{-2} M en acétylcholine. La limite de détection de l'acétylcholine, selon les conditions expérimentales indiquées précédemment, est située aux alentours de 10^{-4} M.

d) Durée de vie-influence du pH et de la température

L'acétylcholinestérase est une enzyme chère et très facilement dénaturée par l'aldéhyde glutarique lors de la fabrication de la membrane. Les deux cas évoqués lors des études sur l'uréase concernant durée de vie, influence du pH et de la température sont transposables à n'importe quelle électrode enzymatique, donc en particulier, à une électrode à acétylcholinestérase. Pour estimer la durée de vie, l'influence du pH et de la température, la membrane enzymatique fabriquée doit être faiblement active,

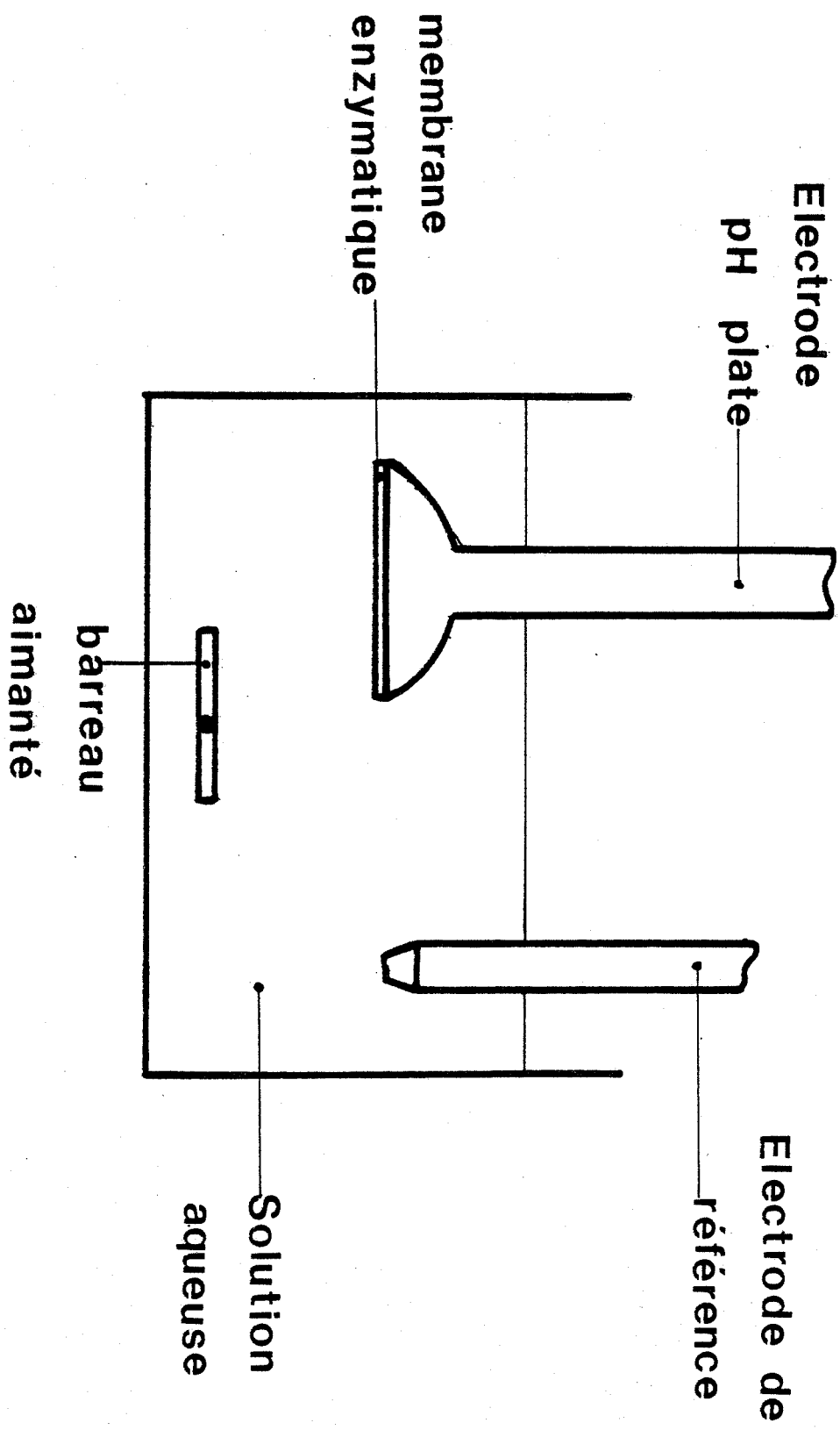


FIGURE 14 - Utilisation d'une électrode plate à AChE pour le dosage de l'acétylcholine.

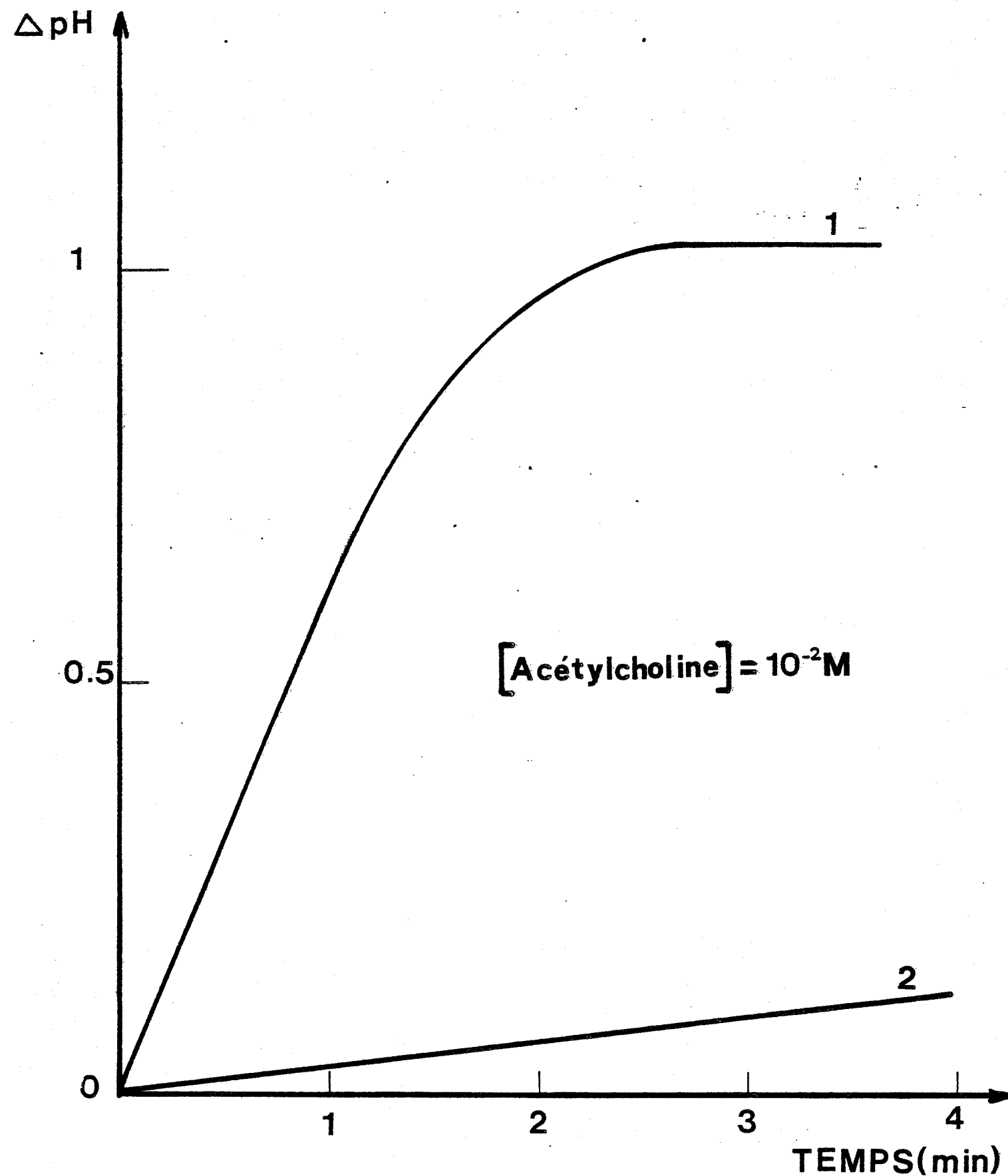


FIGURE 15 - Evolution du pH (1) à l'interface électrode/membrane à AChE
(2) au sein de la phase aqueuse
pour une concentration en acétylcholine égale à 10^{-2} M

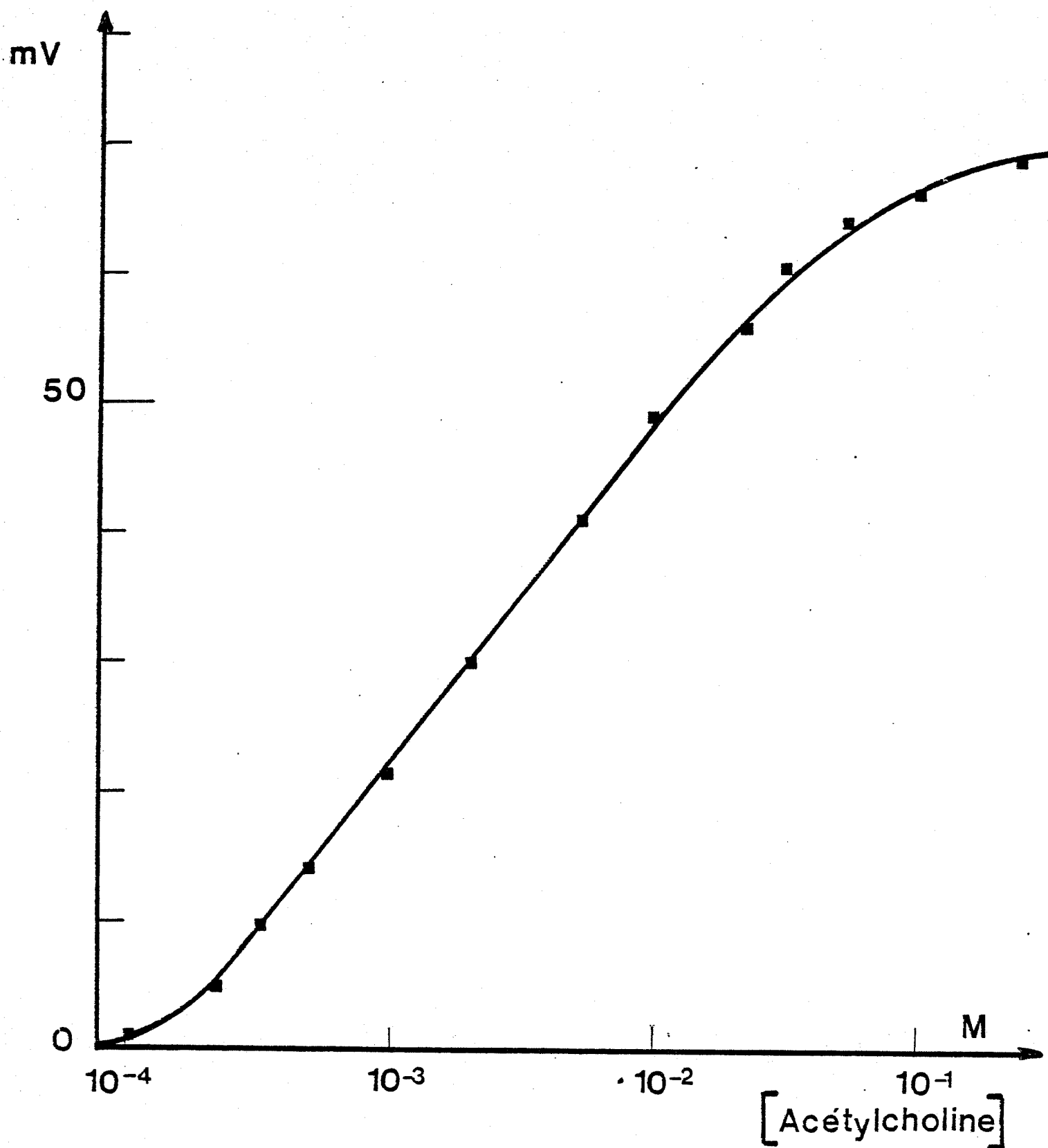


FIGURE 16 - Réponse de l'électrode à acétylcholinestérase en fonction de la concentration en acétylcholine.

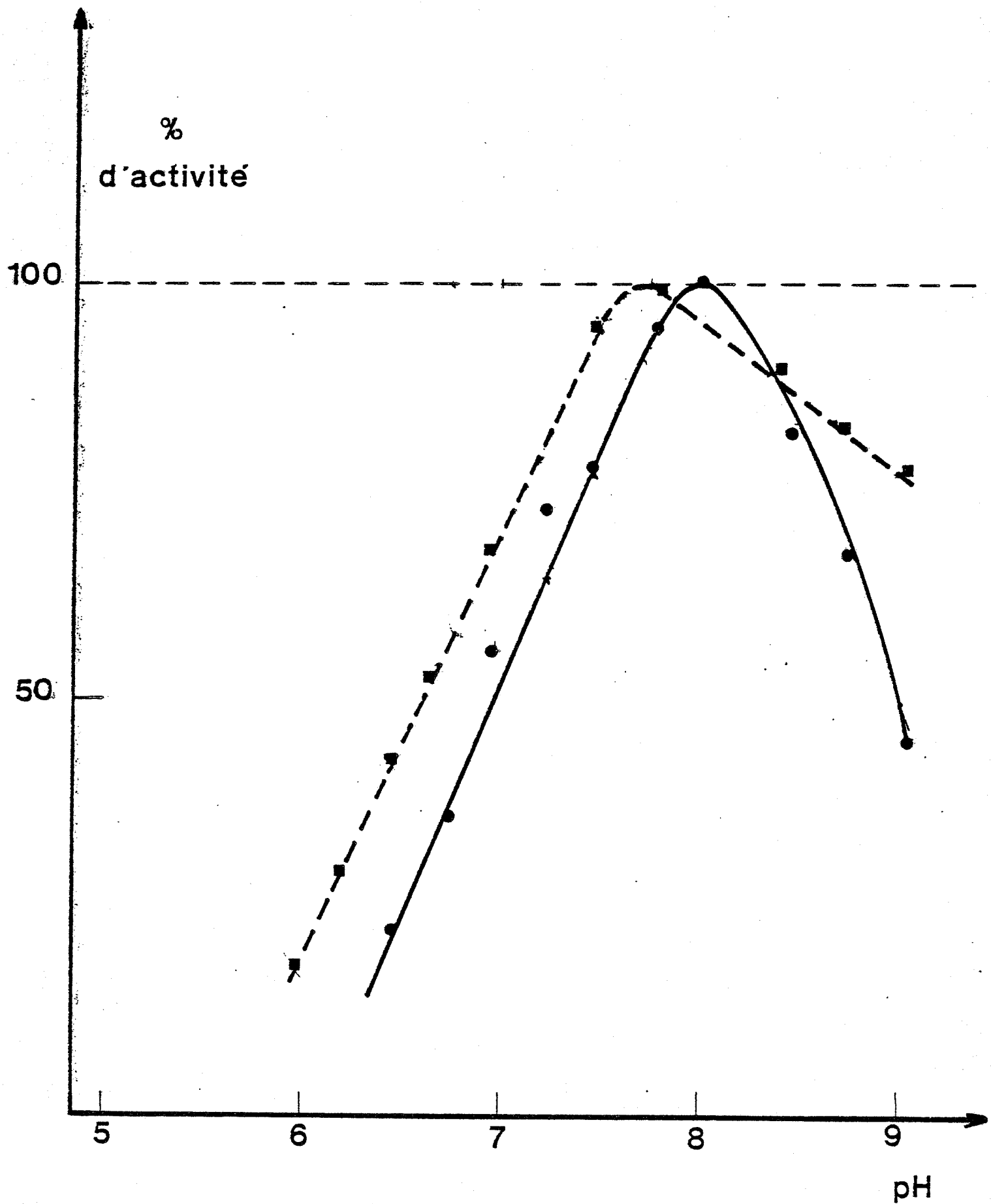


FIGURE 17 - Comparaison de l'activité de l'AChE immobilisée (—) et en solution (----) en fonction du pH pour une concentration d'acétylcholine de 10^{-2} M.

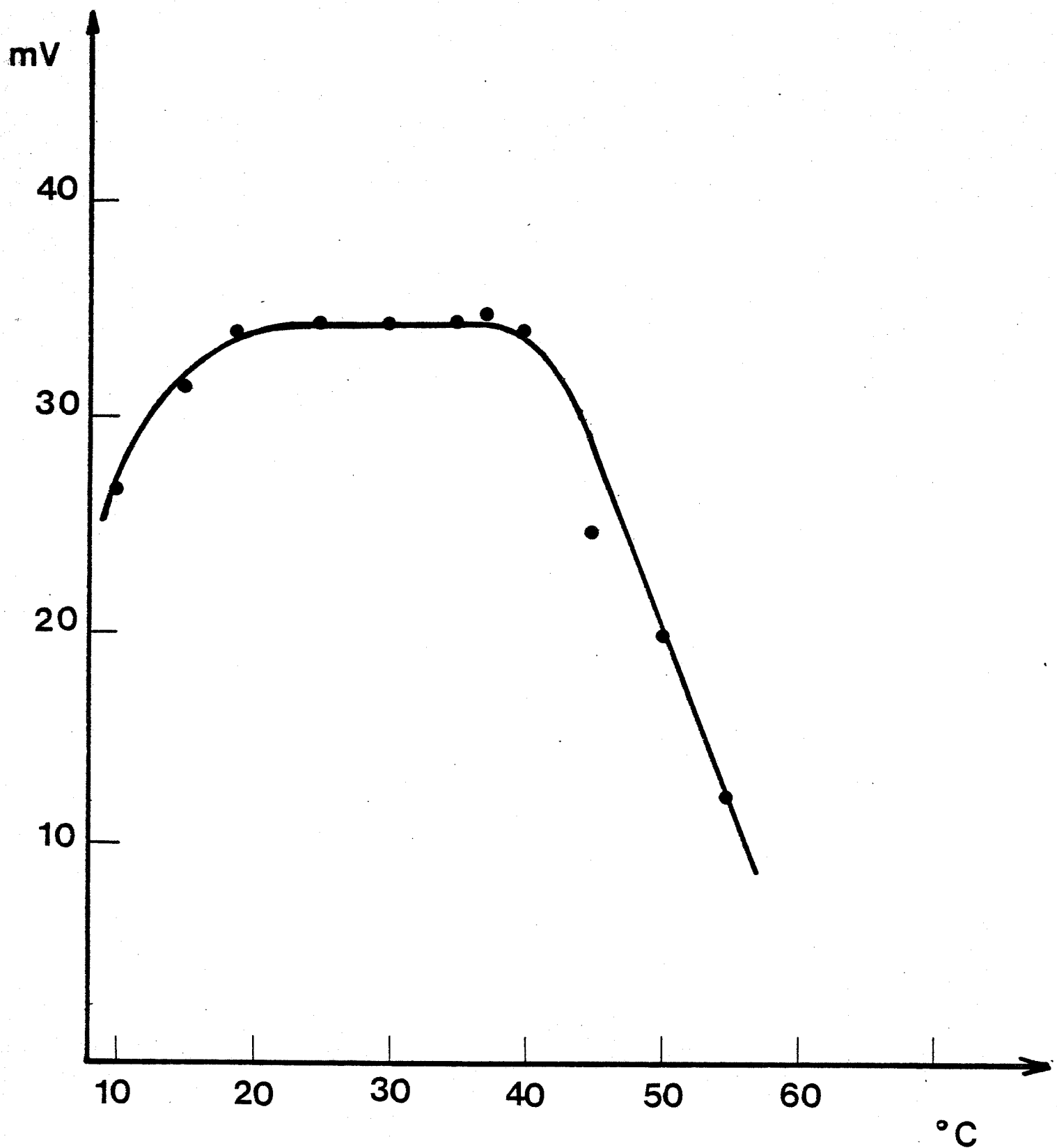


FIGURE 18 - Réponse de l'électrode à acétylcholinestérase en fonction de la température pour une concentration d'acétylcholine de 10^{-2} M.

c'est-à-dire que la partie linéaire de la courbe de réponse ne se confonde pas avec la droite limite.

Dans la majorité des cas, la durée de vie de la membrane enzymatique est supérieure à un mois. Les essais concernant le pH optimum et la température [R. GUYONNET - 1978] montrent que :

- le pH optimum de travail de l'acétylcholinestérase immobilisée se situe au voisinage de $\text{pH} = 8,0$. En phase homogène, il se situe aux alentours de $\text{pH} = 7,6$ (figure 17)
- la température maximale de travail se situe aux alentours de 37°C . Au delà de 40°C , il y a diminution de l'activité enzymatique, et dénaturation de l'acétylcholinestérase (figure 18).

e) Remarque

Compte tenu du principe même de fonctionnement de l'électrode à acétylcholinestérase utilisant une électrode pH, il convient de prendre toutes les précautions lors de la comparaison des résultats théoriques et expérimentaux. Le pH à l'intérieur de la membrane enzymatique peut varier de 1 à 2 unités pH dans certains cas. Aussi, il semble très difficile de considérer que V_m et K_m restent sensiblement constants en tout point de la membrane, hypothèse admise lors de l'étude théorique.

Des travaux sont en cours au Laboratoire de l'Ecole Nationale des Mines, [D. VALLIN - Thèse en cours], incluant dans les calculs les variations de V_m et K_m en fonction du profil de pH au sein de la membrane enzymatique.

IV) CAPTEUR POUR LE DOSAGE DE L'ACIDE URIQUE

1) PREAMBULE

L'uricase ou urate oxidase décompose un produit biologiquement important : l'acide urique selon la réaction:

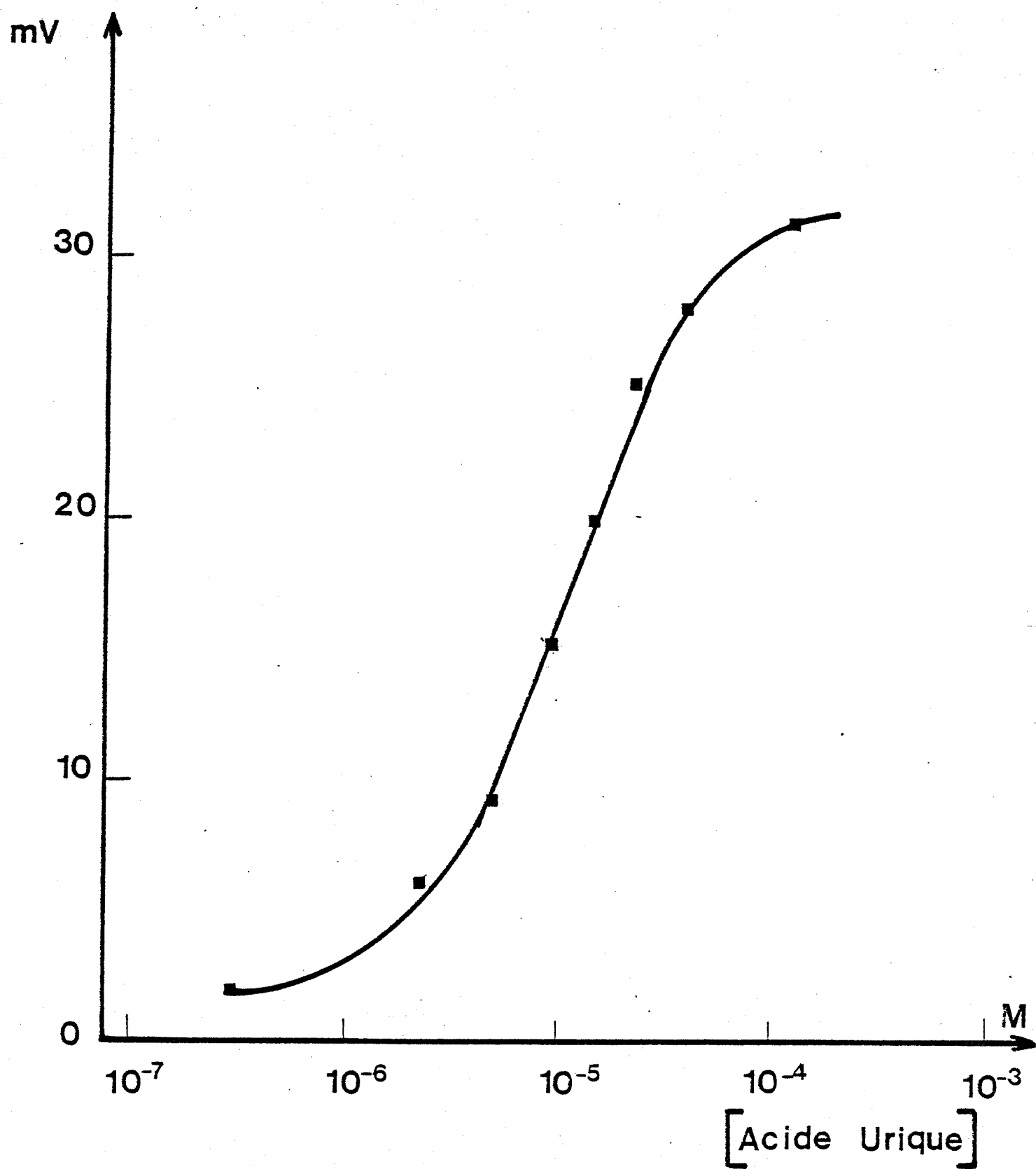
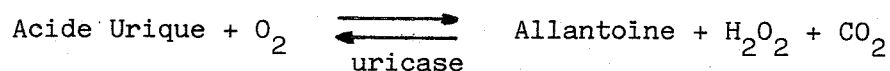


FIGURE 19 - Courbe de réponse de l'électrode à uricase en fonction de la concentration en acide urique.



Un des produits de la réaction peut être facilement détecté en utilisant une électrode à PCO_2 .

La réaction étant réversible, nous avons pensé coupler à l'uricase une autre enzyme : la catalase, afin de décomposer l'eau oxygénée produite.

2) MISE AU POINT DE L'ELECTRODE ENZYMATIQUE

- Electrode utilisée : électrode PCO_2 E5036 de RADIOMETER - membrane silicone.
- La fabrication de la membrane est identique à celle précédemment décrite.
- L'électrode enzymatique plonge dans une solution tampon phosphate 0,25 M, pH = 7,0 à la température de 25°C.

3) COURBE DE REPONSE

Le temps mis pour atteindre l'état stationnaire est de 5 à 10 minutes. La courbe de réponse de l'électrode à uricase en fonction de la concentration en acide urique dans la phase aqueuse (figure 19) présente une partie linéaire comprise entre 10^{-6} et 10^{-4} M en acide urique.

4) DUREE DE VIE

De l'ordre de un mois, sans conditions particulières de stockage et sans perte d'activité notable.

5) REMARQUE

La fabrication de la membrane enzymatique présente une difficulté : la catalase se dissout très mal dans l'albumine humaine, et la membrane

n'est pas toujours parfaitement homogène.

D'autre part, il convient de réaliser un apport en oxygène, afin de faire démarrer la réaction. Enfin le prix de l'enzyme ne facilite pas son utilisation en pratique.

V) CONCLUSION DE L'ETUDE

Des électrodes enzymatiques dont nous avons décrit la fabrication et les essais au cours de ce chapitre, nous en retiendrons deux pour l'étude des inhibiteurs : l'électrode à uréase et l'électrode à acétylcholinestérase, utilisant une électrode pH plate. Mais pour cette dernière, nous ne devons pas perdre de vue que les conditions expérimentales ne sont pas strictement identiques aux hypothèses de travail de l'étude mathématique.

Les deux électrodes retenues ont des durées de vie suffisamment longues pour nous permettre de mener plusieurs expérimentations consécutives lors de l'étude des inhibiteurs. Ce sont des capteurs fiables, aux réponses reproductibles.

Si nous désirons avoir un capteur peu sensible aux variations de pH et de température, la membrane enzymatique devra être très active ; nous l'obtiendrons en réticulant une quantité importante d'enzyme, avec peu d'aldéhyde glutarique pendant un temps de réticulation court (2 minutes par exemple).

L'activité de la membrane fabriquée a une grande importance pour la suite de nos travaux. Si nous désirons suivre la moindre modification d'activité, nous devons alors fabriquer une membrane enzymatique peu active. Au contraire, si nous souhaitons masquer toute variation d'activité, la membrane devra être très active. Ces conclusions auront une importance capitale lors des études des chapitres VIII et IX.

CHAPITRE VII

ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE

DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENE

CHAPITRE VII

ELECTRODES ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE
DE L'INHIBITION ENZYMATIQUE EN PHASE HETEROGENEI) INTRODUCTION

L'étude de l'inhibition enzymatique est difficile à mener en phase homogène. L'étude de la réversibilité de l'inhibition n'est pas aisée, la ré-utilisation de l'enzyme étant très problématique.

Aussi, l'idée de fixer l'enzyme sur un support résistant devrait nous permettre, non seulement de ré-utiliser un nombre important de fois les mêmes enzymes, mais surtout d'aborder l'étude de l'inhibition enzymatique sous un angle plus pratique.

L'étude de la réversibilité de l'inhibition est plus facile et des méthodes de régénération, en cas de blocage des sites enzymatiques peuvent être envisagées. Cette étude doit déboucher logiquement sur le dosage des inhibiteurs en phase aqueuse, ainsi que le dosage de substrats en présence d'inhibiteurs.

II) ETUDE THEORIQUE1) RAPPEL : DIFFERENTS TYPES D'INHIBITION DES ENZYMES

Lors d'une réaction enzymatique, un certain nombre de substances peuvent agir sur l'activité enzymatique. Ces produits sont désignés par le terme "effecteurs" et sont classés en inhibiteurs ou activateurs selon qu'ils diminuent ou augmentent la vitesse de la réaction enzymatique en phase homogène.

Ces effecteurs sont dits réversibles ou irréversibles, selon

que l'enzyme peut être ou non régénérée spontanément en l'absence d'inhibiteurs.

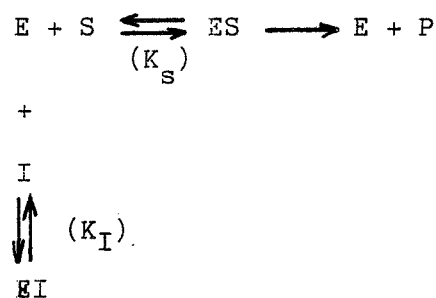
De manière globale, les inhibiteurs sont classés en 3 catégories :

- inhibiteurs compétitifs
- inhibiteurs anti-compétitifs
- inhibiteurs non-compétitifs.

a) Inhibiteurs compétitifs

L'inhibiteur I se fixe uniquement sur l'enzyme E, selon

le schéma :



avec

$$\left[\begin{array}{l}
 I = \text{inhibiteur, } S = \text{substrat} \\
 EI = \text{complexe enzyme-inhibiteur} \\
 ES = \text{complexe enzyme-substrat} \\
 K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}, \quad K_S = \frac{[E][S]}{[ES]}
 \end{array} \right.$$

La vitesse de la réaction enzymatique s'écrit [J.B.

SUMMER - 1951]

$$v = V_m \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

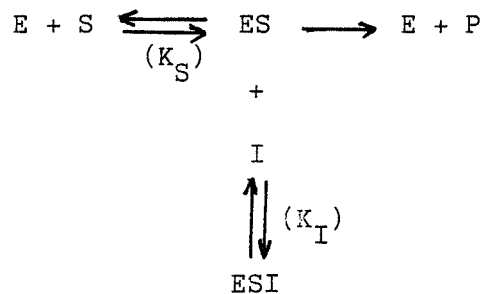
en posant $r = 1 + \frac{[I]}{K_I} \implies v = V_m \frac{[S]}{[S] + rK_m}$

Mathématiquement, l'expression de la vitesse de la réaction est identique à celle d'une réaction enzymatique en absence d'inhibiteurs, dont les constantes de Michaelis seraient $V'_m = V_m$ et $K'_m = rK_m$

Seule la constante K_m varie, la vitesse initiale V_m reste inchangée. Ce type d'inhibition a été parfois appelé inhibition de type K.

b) Inhibiteurs anti-compétitifs

Le mode d'action de l'inhibiteur I est mis en évidence par le schéma :



La vitesse de la réaction enzymatique s'écrit alors [J.B. SUMMER - 1951].

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \times \frac{[S]}{[S] + \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}}}$$

en posant $r = 1 + \frac{[I]}{K_I} \Rightarrow v = \frac{V_m}{r} \times \frac{[S]}{[S] + \frac{K_m}{r}}$

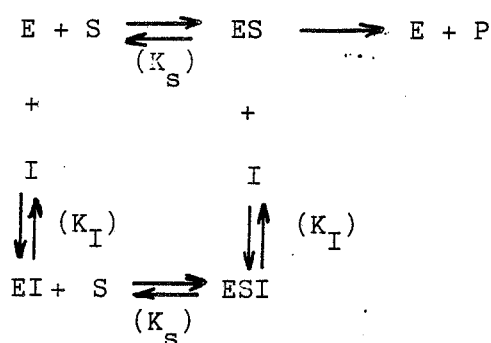
D'un point de vue essentiellement mathématique, l'action d'un inhibiteur anti-compétitif revient à modifier les deux constantes de Michaelis V_m et K_m .

$$V'_m = \frac{V_m}{r} \quad \text{et} \quad K'_m = \frac{K_m}{r}$$

Ce type d'inhibition est parfois appelé inhibition de type KV.

c) Inhibiteurs non-compétitifs

L'action de l'inhibiteur I est mise en évidence par le schéma :



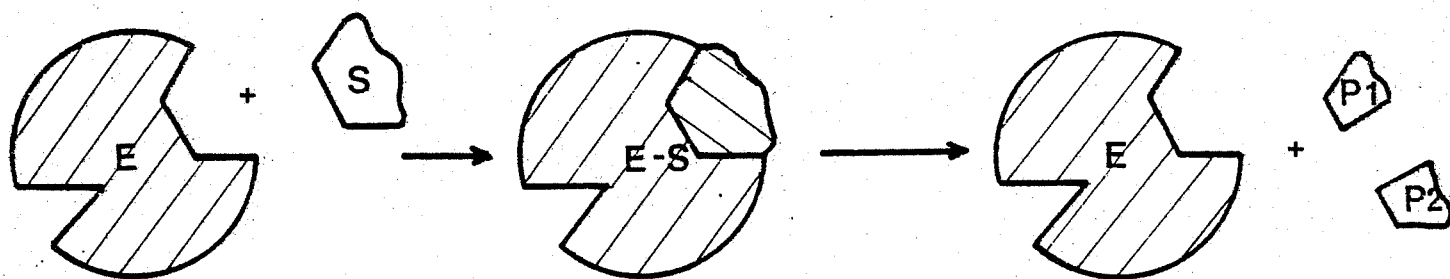
Etant donné que S et I ne se fixent pas sur le même site, on suppose que la présence de S modifie très peu l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.

$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \approx \frac{[E][I]}{[EI]}$$

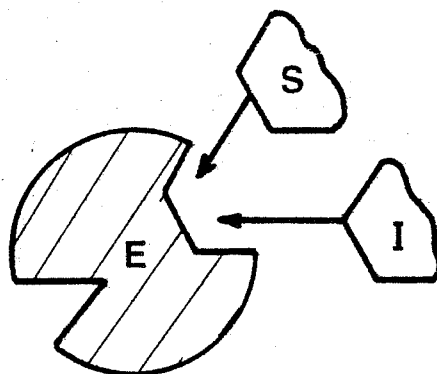
La vitesse de la réaction enzymatique s'écrit alors [J.B. SUMMER - 1951].

$$v = \frac{V_m}{\left[1 + \frac{[I]}{K_I}\right]} \times \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

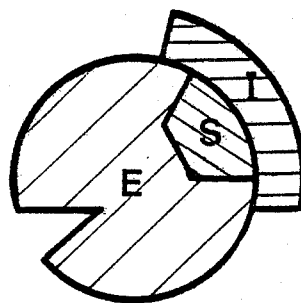
en posant $r = 1 + \frac{[I]}{K_I} \Rightarrow v = \frac{V_m}{r} \frac{[S]}{[S] + K_m}$



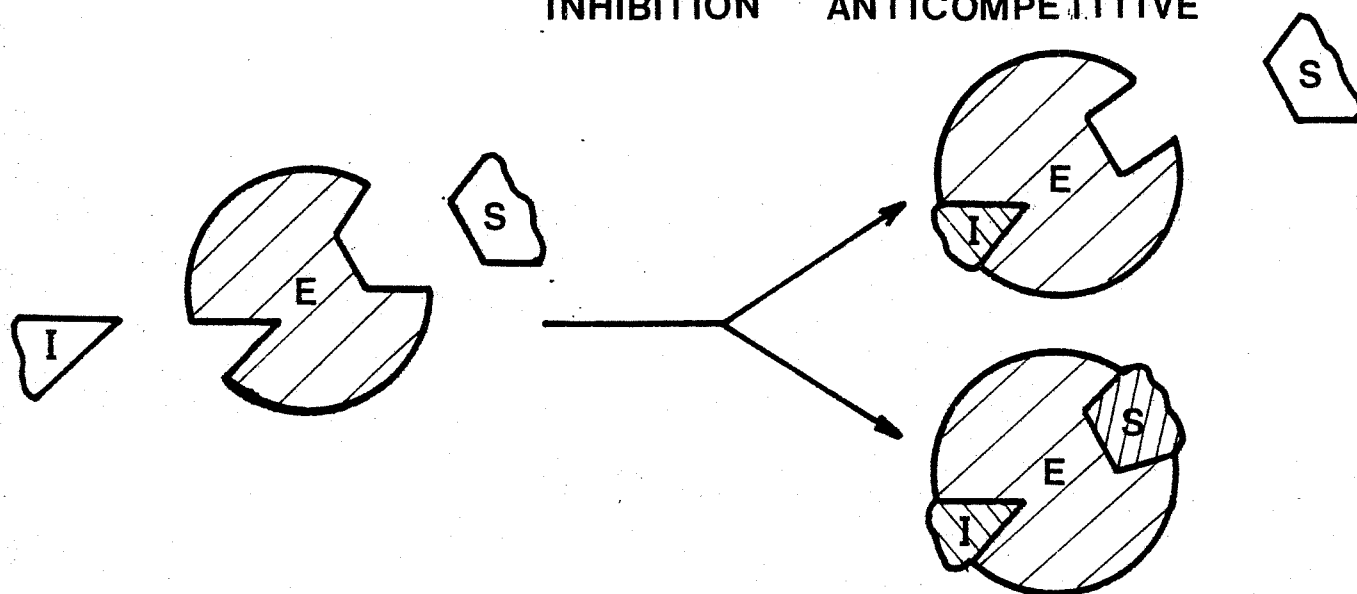
REACTION ENZYMATIQUE



INHIBITION COMPETITIVE



INHIBITION ANTICOMPETITIVE



INHIBITION NON-COMPETITIVE

FIGURE 1 - Schéma des différents types d'inhibition.

Ce qui revient, d'un point de vue essentiellement mathématique, à modifier une seule des constantes Michaeliennes : V_m

$$V'_m = \frac{V_m}{r} \quad \text{et} \quad K'_m = K_m$$

Ce type d'inhibition est parfois appelé inhibition de type V.

d) Conclusion

- L'action d'un inhibiteur peut être schématisée globalement par les graphiques figure 1.

- Mathématiquement, l'action d'un inhibiteur, au niveau de l'expression de la vitesse de la réaction enzymatique, revient à remplacer les constantes de Michaelis V_m et K_m par les constantes:

$$V'_m = V_m \times f(r)$$

$f(r)$ et $g(r)$ étant des fonctions dépendant du seul rapport r

$$K'_m = K_m \times g(r)$$

$$r = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$r \geq 1 \quad \text{et} \quad r = 1 \quad \text{si} \quad [I] = 0$$

2) ETUDE MATHEMATIQUE

a) Préambule

Les méthodes utilisées en phase aqueuse, en particulier la méthode de LINEWEAVER - BURK [K.J. LAIDLER et P.S. BUNTING - 1973], ne sont plus applicables lorsque l'enzyme n'est plus répartie de manière homogène au sein de la solution de substrat.

Nous avons donc repris les méthodes mathématiques uti-

lisées lors de notre étude théorique: Chapitre. V. Nous nous sommes placés dans le cadre de l'état stationnaire, et nous avons utilisé l'analyse numérique afin d'atteindre la totalité de la courbe. Toutefois, déjà les approximations d'ordre 1 et d'ordre 0 nous ont permis d'effectuer des vérifications intéressantes.

Comme expérimentalement nous n'avons accès qu'à la concentration de produit formé à l'interface membrane/électrode, les études mathématiques se borneront à exprimer $[P]$ en $x = 0$ en fonction de la concentration de substrat S_0 dans la phase aqueuse pour différentes concentrations d'inhibiteurs.

b) Inhibition compétitive

Posons
$$r = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

$$r = 1 \Rightarrow [I] = 0$$

$$r = 2 \Rightarrow [I] = K_I$$

$$r = n \Rightarrow [I] = (n-1) K_I$$

L'étude mathématique est identique à celle menée chapitre V paragraphe IV, en remplaçant les valeurs de V_m et K_m par $V'_m = V_m$ et $K'_m = r K_m$.

En portant en ordonnée ($[P]_{x=0}$) en fonction de la concentration de substrat S_0 dans la phase aqueuse, dans un diagramme bi-logarithmique, pour différentes concentrations d'inhibiteurs exprimées en multiples de la constante K_I , on obtient le réseau figure 2.

Deux remarques s'imposent :

α) Approximation par la cinétique d'ordre 1

Les parties linéaires des courbes de réponse obtenues en présence de différentes concentrations en inhibiteur sont parallèles, résultat attendu, dans la mesure où la pente des parties linéaires est indépendante des caractéristiques de la membrane et égale à 1. D'autre part, plus la quantité d'inhibiteur est importante (r élevé), plus l'ordonnée à

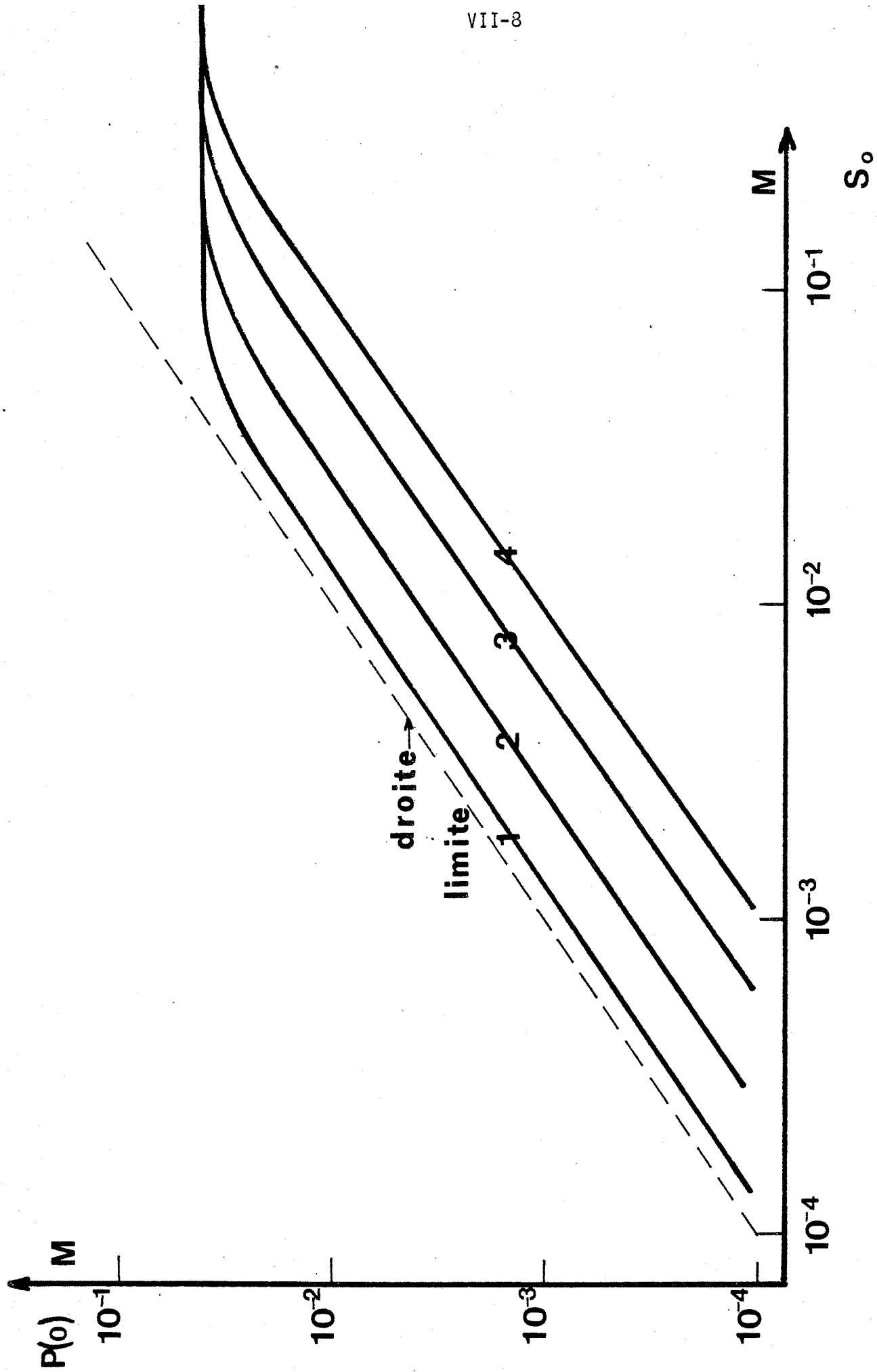


FIGURE 2 - Réponse théorique d'une électrode enzymatique pour différentes concentrations d'inhibiteurs compétitifs

l'origine de la droite est faible.

Dans l'approximation par la cinétique d'ordre 1, nous avons obtenu :

$$\text{Log} ([P]_{x=0}) = \text{Log} S_0 + \text{Log} \left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)}\right)$$

$$\text{avec } (\lambda e)^2 = \frac{V_m e^2}{DK_m} \quad \text{et} \quad Y = \text{Log} \left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)}\right)$$

Considérons deux solutions de concentration de substrat identique, contenant respectivement deux concentrations en inhibiteurs telles que :

$$[I]_1 < [I]_2$$

$$\text{On a alors : } r_1 < r_2$$

$$(\lambda e)_1 > (\lambda e)_2$$

$$1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_1} > 1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_2}$$

$$\text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_1}\right] > \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_2}\right]$$

Si nous désignons par Y, l'ordonnée correspondant à l'abscisse S_0 , on a :

$$Y_1 > Y_2$$

b) Approximation par la cinétique d'ordre 0

Les paliers des courbes de réponse sont identiques. Dans le cadre de l'approximation par la cinétique d'ordre 0, nous avons obtenu :

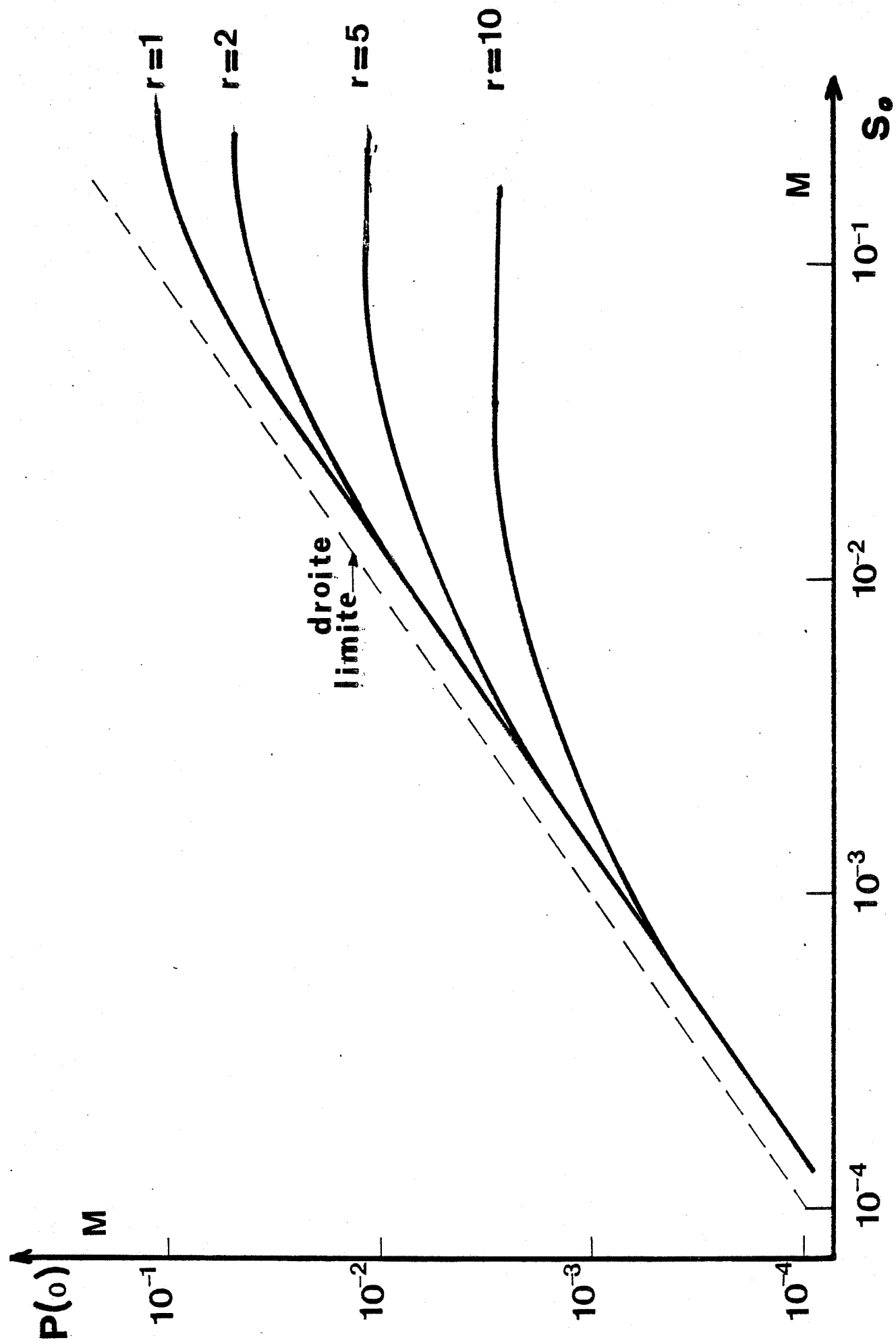


FIGURE 3 - Réponse théorique d'une électrode enzymatique pour différentes concentrations en inhibiteurs anticompetitifs.

$$\text{Log}([P]_{x=0}) = \text{Log}\left(\frac{V_m e^2}{2D}\right)$$

valeur indépendante de K_m . Or dans ce type d'inhibition, V_m reste identique, quelle que soit la concentration en inhibiteur dans la phase aqueuse : le palier des courbes de réponse est donc le même.

c) Inhibition anti-compétitive

$$V'_m = \frac{V_m}{r} \quad K'_m = \frac{K_m}{r}$$

Le réseau théorique des courbes de réponse, pour différentes concentrations d'inhibiteurs, en choisissant K_I comme unité, est mis en évidence figure 3.

Les parties linéaires des courbes de réponse, sont confondues, par contre le palier est plus bas et est atteint plus rapidement lorsque la concentration en inhibiteur dans la phase aqueuse augmente.

Soient deux solutions de substrat de concentration identique contenant chacune un inhibiteur à des concentrations telles que :

$$[I]_1 < [I]_2 \Rightarrow r_1 < r_2$$

α) Approximation par la cinétique d'ordre 1

Comme dans le cas de l'inhibition anti-compétitive, V_m et K_m sont affectés du même rapport r . La valeur de :

$$\lambda e = \sqrt{\frac{V_m/r}{K_m/r} \times \frac{e^2}{D}}$$

ne change pas, on a :

$$(\lambda e)_1 = (\lambda e)_2$$

$$\text{soit} \quad \text{Log}\left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_1}\right) = \text{Log}\left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda e)_2}\right)$$

$$\text{soit} \quad Y_1 = Y_2$$

Les droites ont la même pente et la même ordonnée à l'origine (Y). Elles sont confondues.

β) Approximation par la cinétique d'ordre 0

Si les concentrations en inhibiteurs sont telles que $[I]_1 < [I]_2$ on a :

$$r_1 < r_2$$

La nouvelle valeur $v'_m = \frac{v_m}{r}$, dans le cas de l'inhibition anti-compétitive donne ici :

$$\frac{v_m e^2}{2r_1 D} > \frac{v_m e^2}{2r_2 D}$$

Comme la valeur de l'ordonnée correspondant au palier de la courbe est donnée par :

$$\text{Log}[P]_{x=0} = \text{Log} \left(\frac{v_m e^2}{2rD} \right)$$

on a ici :

$$\text{Log}\left(\frac{v_m e^2}{2r_1 D}\right) > \text{Log}\left(\frac{v_m e^2}{2r_2 D}\right)$$

On en déduit que plus la concentration en inhibiteur est importante, plus la valeur du palier est faible.

d) Inhibition non-compétitive

$$v'_m = \frac{v_m}{r} \quad K'_m = K_m$$

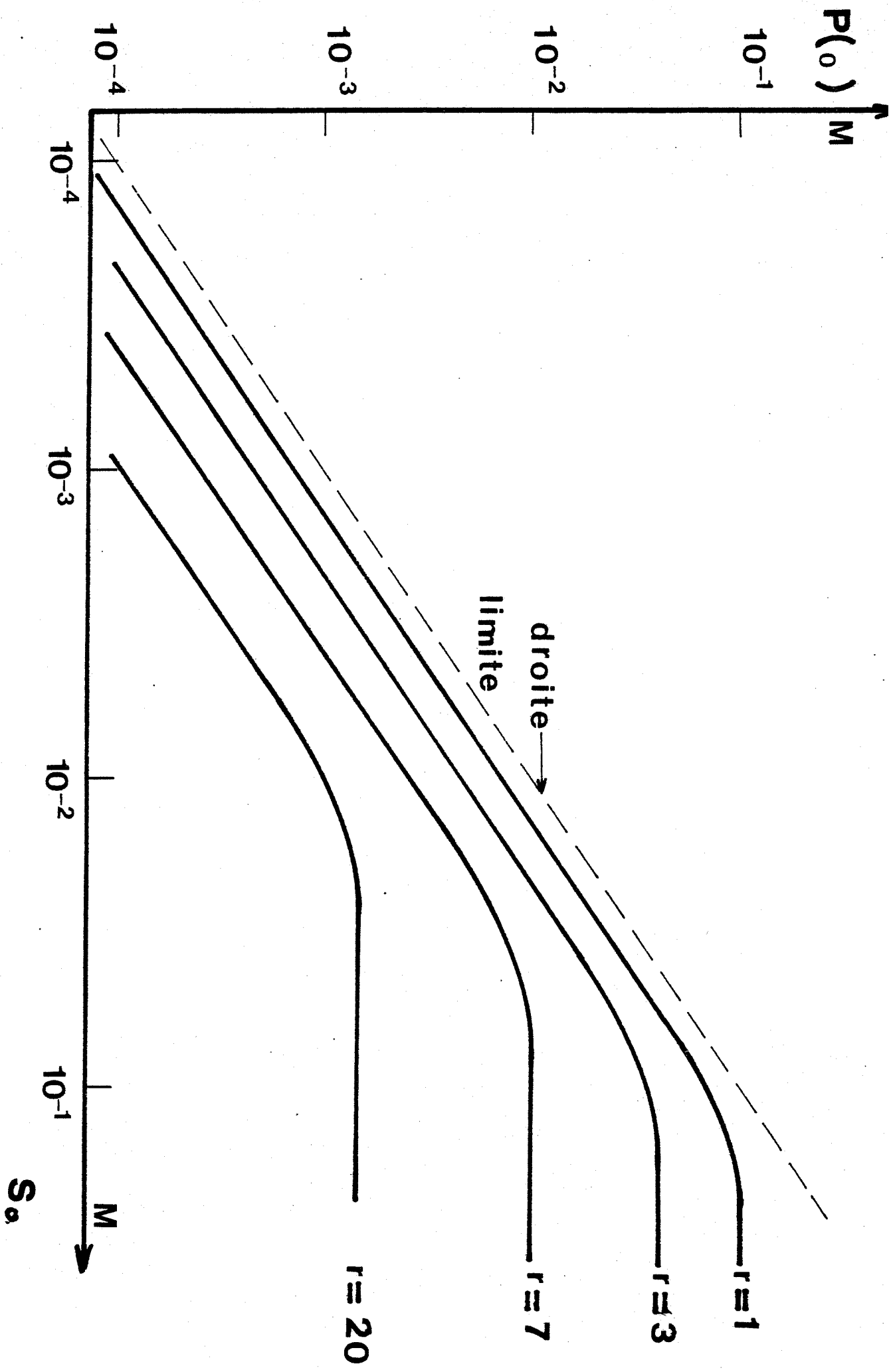


FIGURE 4 - Réponses théoriques d'une électrode enzymatique pour différentes concentrations en inhibiteurs non compétitifs.

Le réseau des courbes de réponse, pour différentes concentrations d'inhibiteurs est donné figure 4. On voit que les parties linéaires des courbes de réponses sont parallèles, par contre les paliers sont d'autant déplacés vers le bas que la concentration en inhibiteur dans la phase aqueuse est importante. La vérification mathématique est la suivante.

Supposons deux solutions de substrat de concentration identique contenant des inhibiteurs à des concentrations telles que :

$$[I]_1 < [I]_2 \Rightarrow r_1 < r_2$$

α) Approximation par la cinétique d'ordre 1

Lorsque l'inhibition est non-compétitive, V_m devient $\frac{V_m}{r}$ en présence de l'inhibiteur donc la valeur de

$$\lambda_e = \sqrt{\frac{V_m/r}{K_m} \times \frac{e^2}{D}}$$

est modifiée :

$$(\lambda_e)_1 > (\lambda_e)_2 \Rightarrow \text{Log}\left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda_e)_1}\right) > \text{Log}\left(1 - \frac{1}{\text{ch}(\lambda_e)_2}\right)$$

Nous pouvons voir l'analogie avec l'inhibition compétitive où l'augmentation de la concentration en inhibiteur abaisse la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite de réponse de l'électrode.

β) Approximation par la cinétique d'ordre 0

Etant donné que K_m n'intervient pas dans l'expression de la valeur du palier, le résultat est identique à celui de l'inhibition anti-compétitive, à savoir que la valeur de la concentration du produit au niveau de l'électrode, correspondant au palier de la courbe de réponse, est plus faible lorsque la concentration en inhibiteur augmente.

e) Conclusion de l'étude

En résumé, il est tout à fait possible de caractériser les trois types d'inhibition étudiés précédemment par l'étude de la courbe de réponse, en absence ($r = 1$) et en présence de l'inhibiteur ($r > 1$), en observant la position relative des courbes de réponse de l'électrode enzymatique :

- partie linéaire parallèle
palier de réponse inchangé \Rightarrow inhibition compétitive
- partie linéaire inchangée
palier de réponse plus bas \Rightarrow inhibition anti-compétitive
- partie linéaire parallèle
palier de réponse plus bas \Rightarrow inhibition non-compétitive

L'inhibition non-compétitive apparaît ainsi comme étant la combinaison des résultats des deux autres types d'inhibition.

f) Influence de l'activité enzymatique de la membrane

Un inhibiteur, au sein d'une membrane enzymatique, a une action précise sur les constantes de Michaelis V_m et K_m selon que l'inhibiteur est compétitif, anti ou non compétitif. Faire agir un inhibiteur, revient globalement à diminuer l'activité de la membrane enzymatique.

Les profils de concentration de S et P au sein de la membrane vont être modifiés. Nous retrouvons aussi les deux cas limites évoqués au chapitre précédent (chapitre V paragraphe V) :

$\alphaSi la membrane est active, la présence d'un inhibiteur au sein de la solution aqueuse n'est pas forcément détectée puisque la mesure expérimentale s'effectue sur la face interne membrane enzymatique/électrode et que seule l'activité enzymatique de la face externe est mise à contribution.$

β) Au contraire, si la membrane est peu active, toute présence d'inhibiteur est immédiatement détectée puisque la totalité de l'activité enzymatique est exploitée.

Les figures 6 et 7 du chapitre VI permettent de visualiser les phénomènes ci-dessus.

Conclusion :

- Si l'objet de l'étude est l'influence d'un inhibiteur sur une enzyme réticulée, ou la détection de cet inhibiteur, notre choix se portera sur une membrane enzymatique peu active, de telle façon que la présence d'inhibiteur même à l'état de traces, se traduise par une diminution de la réponse du capteur.

- Si nous souhaitons limiter l'influence d'un inhibiteur par rapport à la réponse du capteur, notre choix se portera sur une membrane très fortement active. Résultat que nous mettrons en pratique lors du dosage d'un substrat (l'urée) en présence d'un inhibiteur (ions fluorures) [Chapitre VIII paragraphe II].

g) Définition du pourcentage d'inhibition

Pour des raisons pratiques, nous avons défini le pourcentage d'inhibition par la relation :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[1 - \frac{[P(O)]_{[I] = I_0}}{[P(O)]_{[I] = 0}} \right] \times 100$$

$[P(O)]_{[I] = I_0}$ = concentration de produit à l'interface interne membrane enzymatique/électrode à l'état stationnaire en présence d'une concentration en inhibiteur dans la phase aqueuse égale à I_0 .

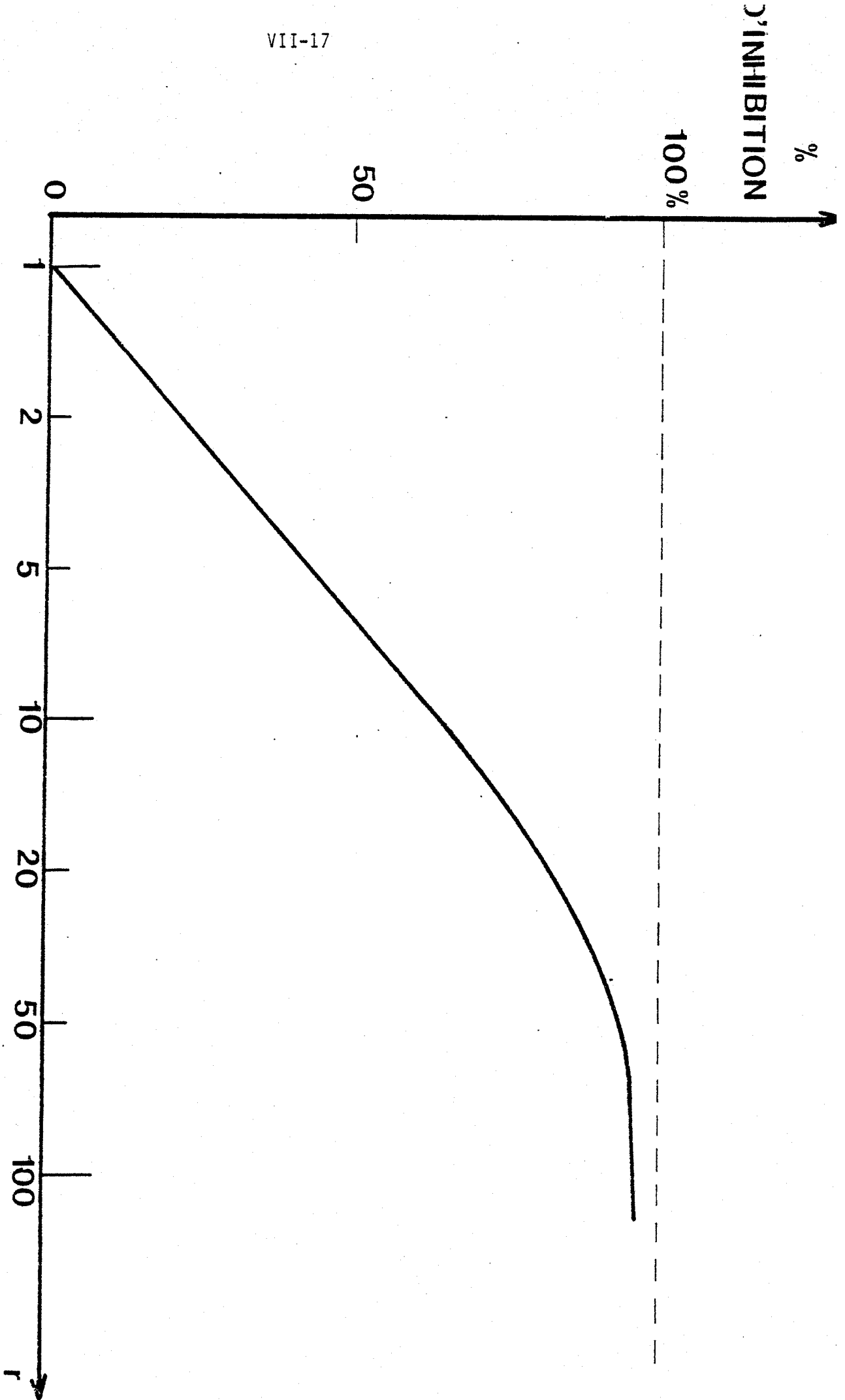


FIGURE 5 - Pourcentage d'inhibition calculé en fonction de r dans un diagramme semi-logarithmique.

$[P(0)]_{[I]} = 0$ = définition identique mais en l'absence d'inhibiteur dans la phase aqueuse.

h) Etude théorique du pourcentage d'inhibition

A partir de l'étude mathématique précédente, il est possible de tracer la courbe pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme du nombre sans dimension r . Pour $r = 1$, $[I] = 0$ donc :

$$\% \text{ d'inhibition} = 0$$

La courbe obtenue présente, quel que soit le type de l'inhibition, une partie linéaire, puis s'incurve lorsque r croît indéfiniment (figure 5).

i) Effet de l'inhibition anti-compétitive sur l'activité apparente de la membrane

α) Faisons varier l'activité enzymatique de la membrane (V_m), la concentration en substrat dans la phase aqueuse restant constante. Les courbes donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de r ont des parties linéaires sensiblement parallèles et sont d'autant déplacées vers la droite que la membrane est active. Plus la membrane est active et moins la détection de l'inhibiteur est bonne (figure 6). Cette remarque sera mise à profit lors des études chapitre VIII, paragraphe I-1 et paragraphe II-1.

β) Pour une activité V_m constante d'une membrane enzymatique, étudions, dans le cadre d'une inhibition anti-compétitive, l'évolution des courbes donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de r pour différentes concentrations en substrat S_0 dans la phase aqueuse. Les courbes données par la figure 7 ont leurs parties linéaires sensiblement parallèles. La courbe est d'autant déplacée vers les concentrations en inhibiteur élevées que la concentration en substrat S_0 est faible.

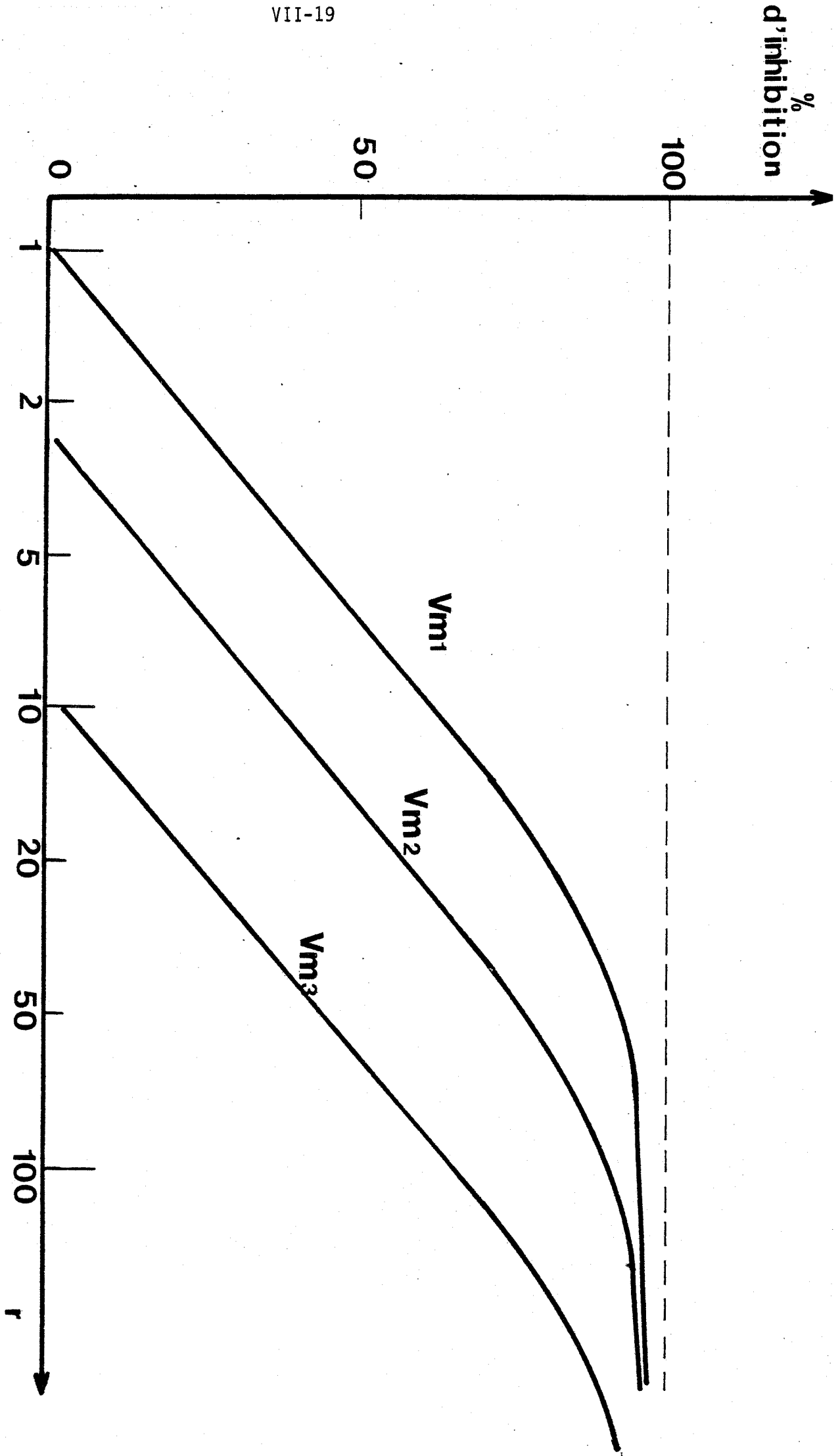


FIGURE 6 - Pourcentage d'inhibition calculé en fonction de r .
Translation des courbes pour différentes activités V_m de la membrane enzymatique dans le cas de l'inhibition non compétitive.

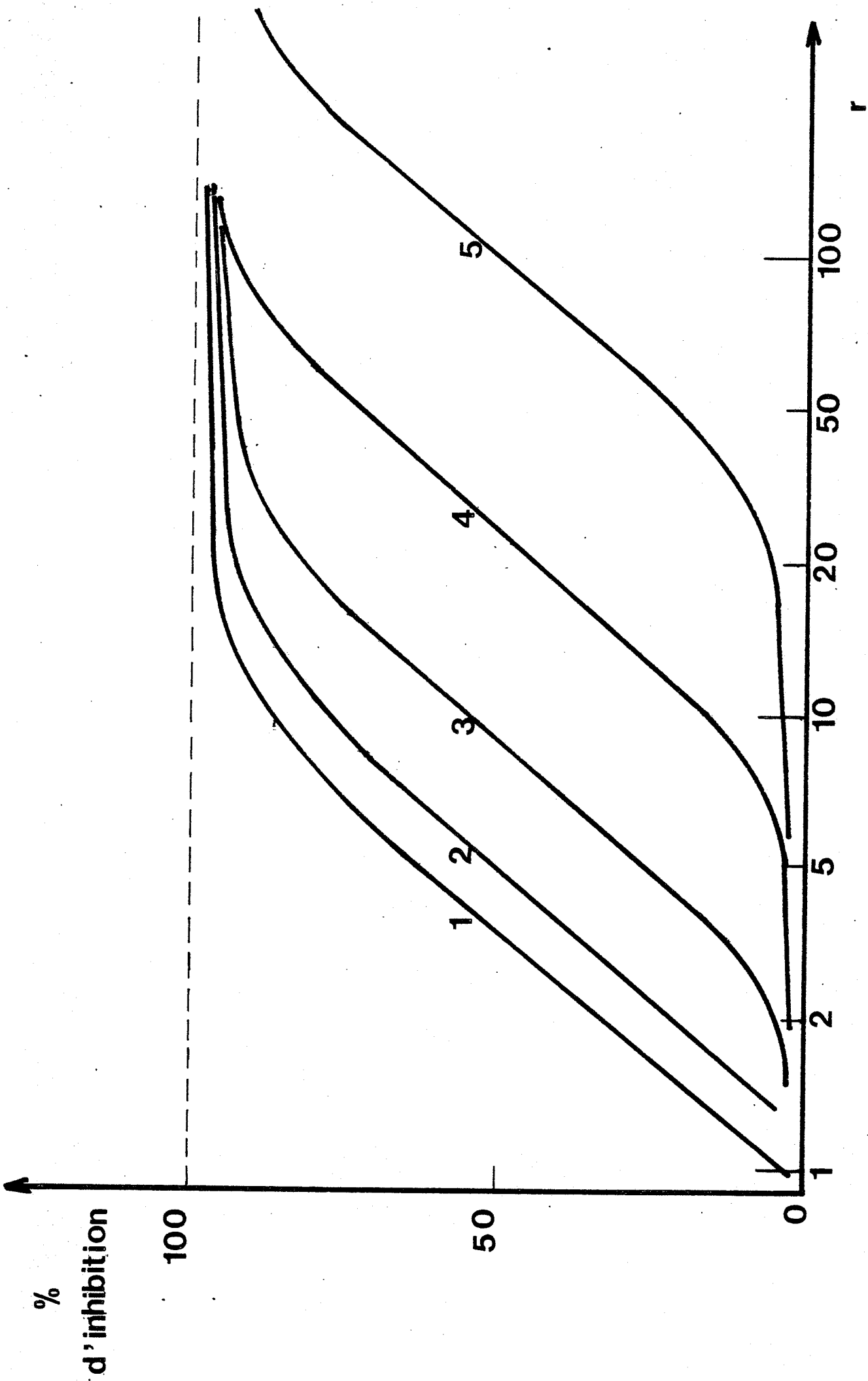


FIGURE 7 - Inhibition anticompetitive

Pourcentage d'inhibition calculé en fonction de r pour différentes concentrations en substrat dans la solution exprimée en unité K_m

(1) $K_m = 0.5$ (2) $0.3 K_m$ - (3) $0.2 K_m$ - (4) $0.1 K_m$ - (5) $0.05 K_m$

Remarque : L'étude théorique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur (exprimée en unités K_I) pour des inhibiteurs de type compétitif ou non-compétitif, a donné des résultats se traduisant par une variation de pente de la courbe pourcentage d'inhibition initiale.

Ces résultats sont difficilement exploitables pratiquement ; seule l'inhibition de type anti-compétitif peut être mise en évidence.

Conclusion : La courbe pourcentage d'inhibition peut être un excellent moyen technique permettant de suivre l'évolution de l'activité enzymatique d'une membrane. En particulier, ce moyen a été très utilisé lors de l'étude de l'influence du pH et de la température sur la réponse d'électrodes à uréase actives, en choisissant comme inhibiteur les ions fluorures (chapitre VIII paragraphe III).

j) Analogie de l'inhibition non-compétitive avec une soustraction de sites enzymatiques

L'action d'un inhibiteur non-compétitif, d'un point de vue mathématique, se résume à une diminution de la constante V_m , donc de l'activité de la membrane

$$V'_m = \frac{V_m}{r} \quad \text{et} \quad K'_m = K_m$$

L'action d'un inhibiteur non-compétitif, revient à rendre inactifs un certain nombre de sites enzymatiques, ou en quelque sorte à "soustraire" des sites enzymatiques au sein de la membrane. Cette remarque sera mise à profit lors de l'étude expérimentale de tels inhibiteurs. Il en résultera qu'un inhibiteur non réversible immédiatement (chapitre III-1) se comporte comme un inhibiteur non compétitif.

III) ETUDES EXPERIMENTALES

1) ETUDE DE LA REVERSIBILITE ET DE LA REGENERATION

L'utilisation d'une électrode enzymatique pour déterminer la

réversibilité d'une inhibition est d'un grand intérêt, car elle permet de connaître à tout instant t , moyennant certaines précautions, l'activité de la membrane enzymatique en cours d'inhibition ou de régénération.

Une électrode régénérable permet de ce fait une utilisation répétée.

La membrane enzymatique fabriquée ne devra pas être trop chargée comme nous l'avons démontré, il nous serait difficile de détecter toute variation apparente de son activité vis-à-vis des inhibiteurs.

En conséquence, mathématiquement, la partie linéaire de la courbe de réponse de l'électrode ne devra pas se confondre avec la droite limite.

a) Méthode d'étude de la réversibilité

Compte tenu des remarques formulées précédemment, nous utiliserons la méthode décrite ci-dessous.

- α) Le capteur plonge dans une solution de substrat de concentration S_0 , sans inhibiteur, appelée solution de référence, jusqu'à obtention de l'état stationnaire.
- β) Le capteur est retiré et plongé dans une solution témoin, de concentration en substrat identique, mais contenant un inhibiteur à une concentration $[I]$. Le capteur est laissé en contact avec la solution témoin, jusqu'à ce que l'on atteigne le nouvel état stationnaire correspondant à une nouvelle activité plus faible de la membrane enzymatique.
- γ) Le capteur est rincé abondamment et plongé dans la solution de référence.

Si la réponse du capteur, atteint l'état stationnaire initial, l'inhibition sera dite réversible immédiatement.

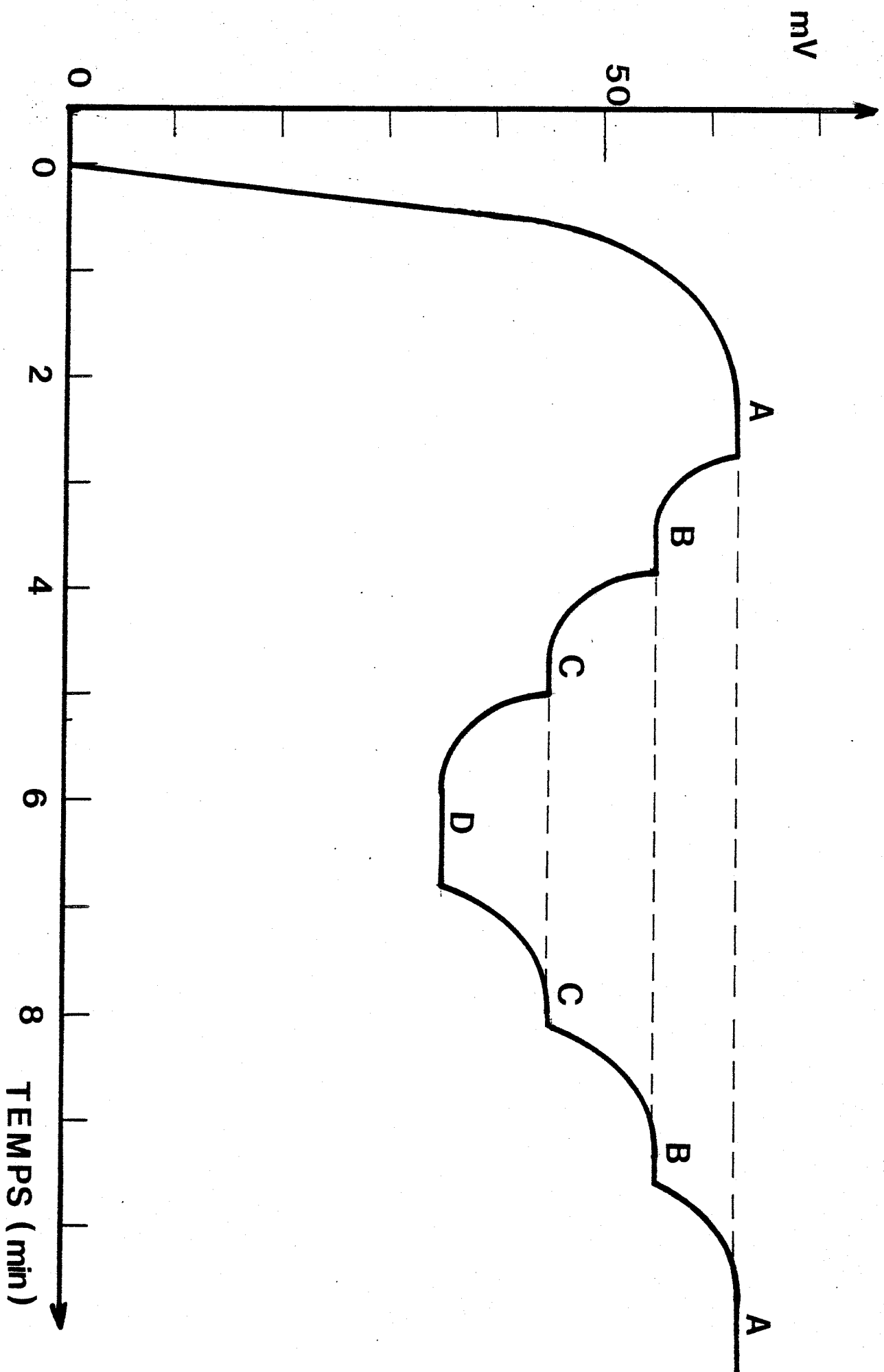


FIGURE 8 - Mise en évidence de la réversibilité de l'action des ions fluorures sur une membrane à uréase
 Conditions expérimentales [urée] = $10^{-2}M$.
 Concentrations en ions fluorures : (A) = 0 - (B) = $2 \times 10^{-3}M$ - (C) $5 \times 10^{-3}M$ - (D) = $2 \times 10^{-2}M$.

Au contraire si le capteur n'atteint plus son état stationnaire initial, l'inhibition sera dite non réversible immédiatement. Le terme irréversible ne sera pas utilisé car l'expérience prouve que certains inhibiteurs, classés dans la littérature sous le vocable irréversibles, se sont révélés être réversibles spontanément à long terme (multiples lavages sur plusieurs jours).

D'autre part, l'élimination de l'inhibiteur peut être fortement accélérée en utilisant certaines substances, appelées substances régénératrices ou régénérateurs. Ces substances ont la propriété de se fixer préférentiellement sur l'inhibiteur et de l'entraîner au cours de lavages successifs.

b) Inhibiteurs réversibles immédiatement

Deux enzymes ont servi de test : l'uréase et l'acétylcholinestérase, pour lesquelles nous avons réalisé des électrodes fiables et reproductibles selon la méthode décrite au chapitre précédent.

Les inhibiteurs réversibles immédiatement que nous avons testés sont, pour l'uréase : les ions fluorures, l'hydroxyurée, la phénylurée, la thiourée.

Pour l'acétylcholinestérase citons : ions fluorures, la nicotine, l'arginine, la néostigmine, physostigmine.

Le cas des ions fluorures est le plus typique. Quatre solutions ont été préparées contenant toutes une concentration en urée égale à $10^{-2}M$ et 0, $2 \times 10^{-3}M$, $5 \times 10^{-3}M$ et $2 \times 10^{-2}M$ en ce qui concerne la concentration en ions fluorures [J. BEAUX - 1979].

La figure 8 met en évidence la parfaite réversibilité des ions fluorures avec une membrane à uréase. Le même phénomène s'observe avec une membrane à acétylcholinestérase.

c) Inhibiteurs non réversibles immédiatement

Parmi les inhibiteurs cités dans la littérature, nous

avons étudié pour l'uréase : les ions Ag^+ , Cu^{++} , Hg^{++} .

Pour l'acétylcholinestérase : iodure d'écothiopate, éserine, paraoxon, méthyl et éthyl parathion.

*d) Inhibition de l'uréase immobilisée par les ions
 Ag^+ , Cu^{++} , Hg^{++} . Méthode de régénération*

L'étude de l'inhibition de l'uréase par les métaux lourds a été abordée par SHAW et RAVAL [W.H.R. SHAW - 1954, 1961] et un certain nombre d'auteurs ont tenté de dresser une classification des inhibitions en fonction de leur pouvoir d'inhibition sur l'enzyme [J.B. SUMMER - 1930], [J.F. AMBROSE - 1950], [A. GOLDSTEIN - 1951], [J.F. AMBROSE - 1951], [E.C. THOREN - 1968], [R.B. HUGHES - 1969], [C.M. KUNIN - 1976]. Ces travaux ont tous été effectués en solution et ont tous en commun la difficulté de récupérer l'enzyme après l'action de l'inhibiteur, et de suivre ensuite l'évolution de l'inhibition.

α) Fabrication de l'électrode enzymatique

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition proprement dite, nous avons dû légèrement modifier la méthode de fixation de l'uréase, car la présence d'albumine humaine peut fausser les résultats. En effet, prenons l'exemple de deux électrodes sélectives des ions Cu^{++} . Recouvrons l'une d'elle d'une membrane exempte d'uréase, fabriquée uniquement avec l'albumine humaine et l'aldéhyde glutarique.

Les deux électrodes plongent dans une solution de référence où des ions Cu^{++} sont progressivement rajoutés. Les courbes de réponses des deux électrodes en fonction de la concentration en ions Cu^{++} sont données par la figure 9.

Si la réponse de l'électrode témoin est une droite, par contre, l'électrode recouverte de la membrane albumine-aldéhyde glutarique, ne répond que pour des concentrations en ions Cu^{++} supérieures à $5 \times 10^{-2} \text{M}$. la membrane fabriquée fixe donc les ions Cu^{++} jusqu'à saturation, par l'intermédiaire de l'albumine humaine entrant dans sa composition.

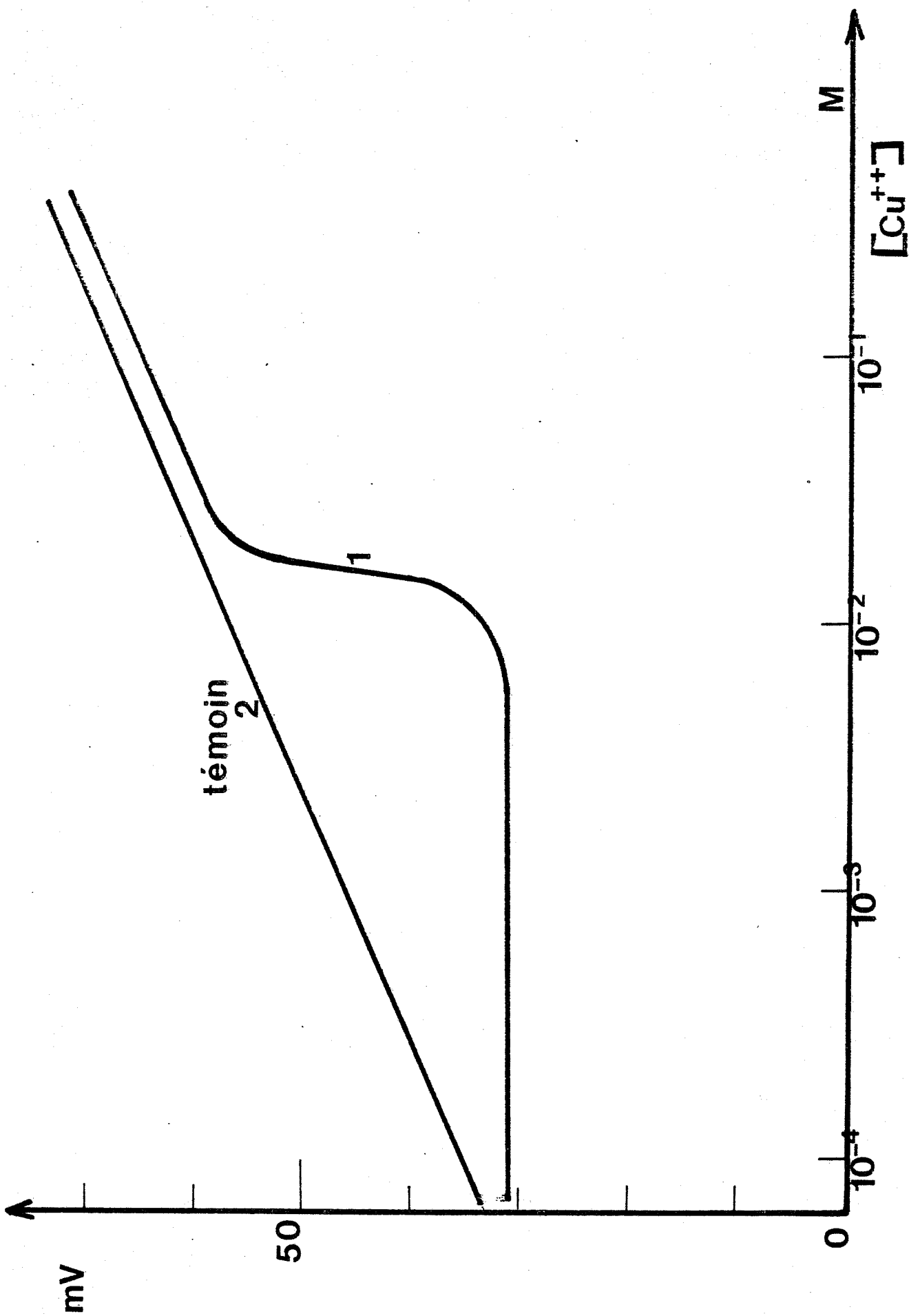


FIGURE 9 - Réponses comparées d'une électrode spécifique aux ions Cu^{++}

(1) recouverte d'une membrane albumine

(2) témoin nue.

Des résultats analogues ont été obtenus avec les ions Hg^{++} , [R. GUYONNET Thèse - 1978 - page 70].

En conclusion, la méthode de fabrication de la membrane enzymatique doit être modifiée de la manière suivante : au cours de la phase 1, l'enzyme est dissoute sans albumine humaine, dans une solution de tampon phosphate pH = 7,0 0,25 M, à température ambiante. Seul le temps de réticulation minimum (1 minute dans le cadre de la méthode initiale) est plus long (10 minutes minimum). La membrane est plus fine et le temps de réponse du capteur s'en trouve amélioré (1 à 2 minutes). Nous n'avons décélé aucune modification quant à la durée de vie de l'enzyme.

β) Etude de l'inhibition

Afin de mener une étude plus complète, nous avons couplé l'étude de la réponse de l'électrode, avec une étude isotopique, menée en collaboration avec René GUYONNET [R. GUYONNET - Thèse - 1978].

Les isotopes choisis sont :

- Argent : ^{110}Ag période 253 jours
émission β^-

pic principal : 0,66 MeV

fourni par le C.E.A. sous la forme de nitrate d'argent d'activité spécifique 1 Ci/gramme.

- Cuivre : la période étant trop courte, l'étude isotopique n'a pas été envisagée.

- Mercure : ^{203}Hg période 47 jours
émission β^-

pic principal 0,279 MeV

fourni par le C.E.A. sous la forme de chlorure mercurique d'activité spécifique 1,8 m Ci/g.

Pour le comptage nous avons utilisé un détecteur puits PICKER, équipé d'un cristal NaI. TI de 2" x 2" permettant le contrôle de la radioactivité au sein de la membrane enzymatique.

Le puits était relié à une chaîne PICKER couplée à un enregistreur.

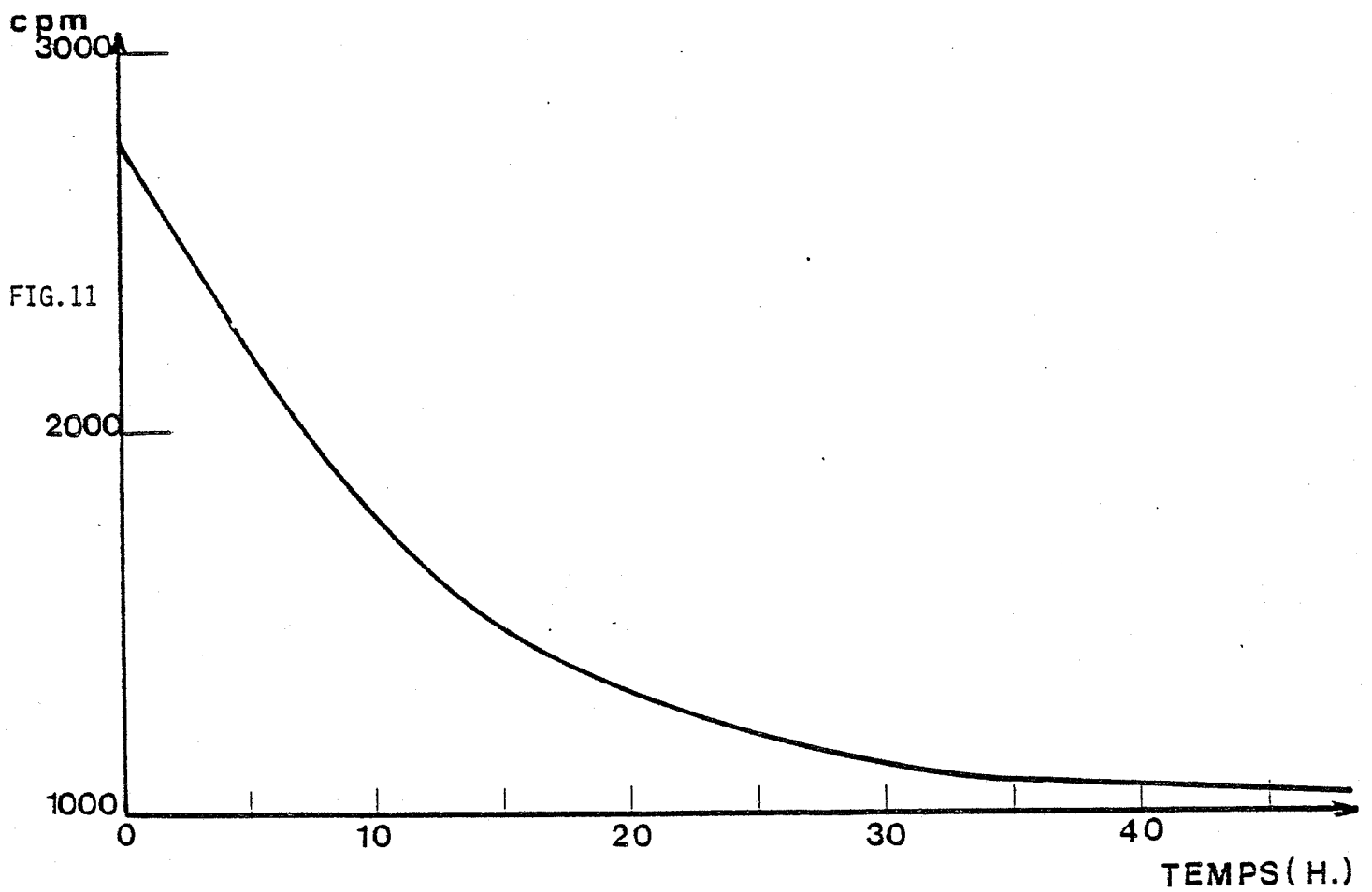
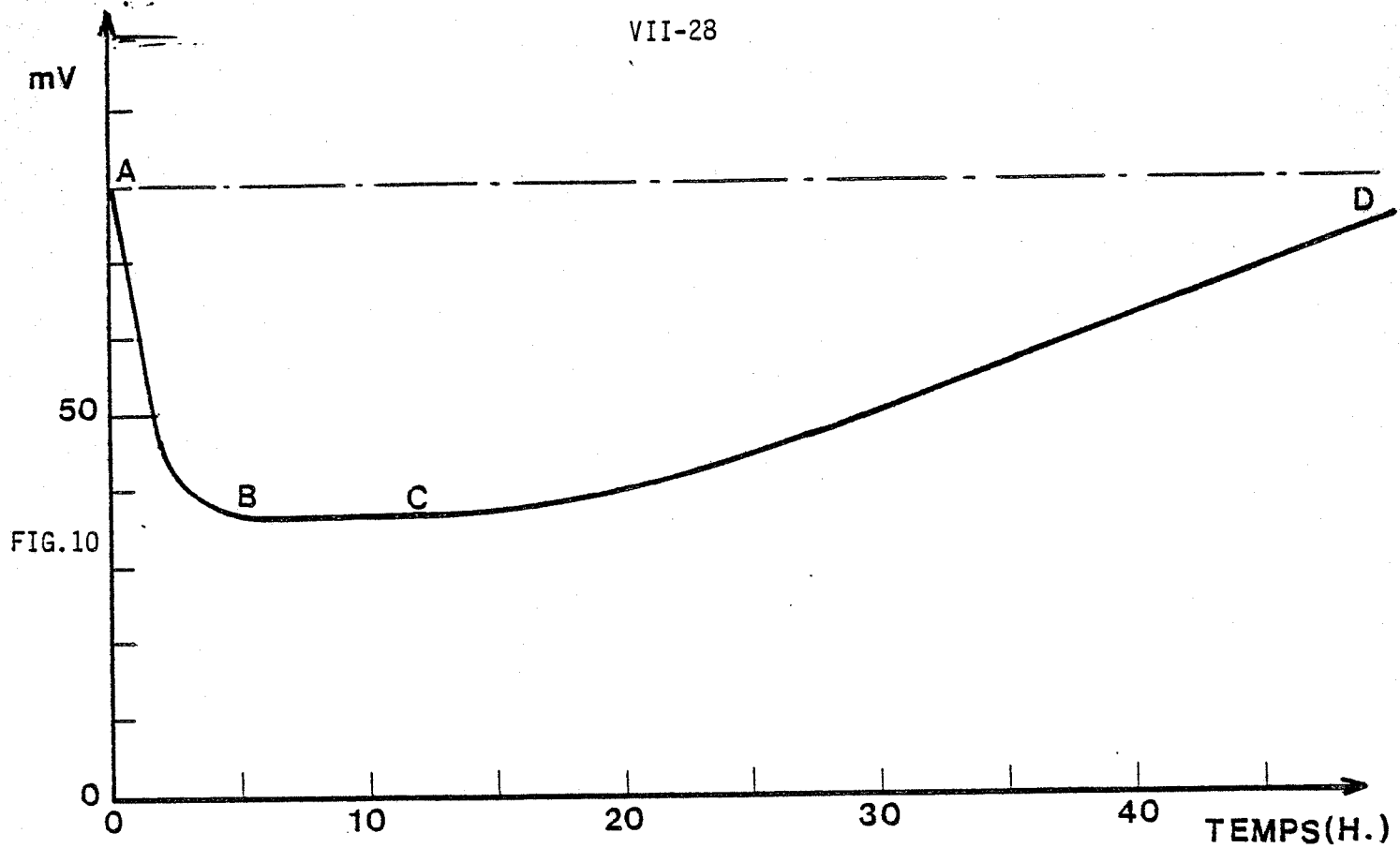


FIGURE 10 - Evolution de la réponse de l'électrode au cours de la régénération spontanée de la membrane enzymatique inhibée par les ions Ag^+ .

FIGURE 11 - Evolution correspondante de la radioactivité de la membrane enzymatique au cours de la régénération spontanée d'une membrane enzymatique inhibée par les ions Ag^+ .

γ) Régénération d'une membrane à uréase
inhibée par les ions Ag^+

L'inhibition de l'uréase en solution par les ions Ag^+ , a été étudiée pour la première fois par SUMMER et MYRBACK [J.B. SUMMER - 1930]. Cette étude reprise par AMBROSE et KISTIAKOWSKY [J.F. AMBROSE - 1951], s'est heurtée à la difficulté de séparer l'enzyme de son milieu réactionnel lors de l'étude de la réversibilité. Notre méthode utilisant une électrode enzymatique permet de résoudre le problème de l'étude de la réversibilité.

Une électrode enzymatique à uréase immobilisée est mise à incuber 10 minutes au sein d'une solution d' AgNO_3 10^{-5}M et $^{110}\text{AgNO}_3$ 0,05 μCi . L'électrode est retirée et plongée dans une solution de tampon phosphate pH = 7,0 0,25 M régulièrement renouvelée. L'activité enzymatique de la membrane est testée au cours du temps ainsi que la radioactivité rémanente de la membrane (figure 10 et figure 11).

La régénération spontanée de la membrane est longue (3 à 4 jours). Si globalement les ions Ag^+ s'éliminent progressivement, par contre l'activité de la membrane passe par trois phases :

- phase A-B (figure 10). L'activité de la membrane décroît rapidement, malgré l'absence d'inhibiteur dans la phase aqueuse - durée $\frac{1}{2}$ heure environ.
- phase B-C (figure 10). L'activité reste stable durée 4 à 5 heures environ.
- phase C-D (figure 10). L'activité croît progressivement pour atteindre exponentiellement l'activité initiale - durée 3 à 4 jours.

Nous avons voulu accélérer la régénération spontanée de la membrane car elle nous paraît trop longue, et n'élimine pas la totalité des ions Ag^+ (sauf au bout d'un temps infini). Une régénération rapide et efficace a été obtenue en plongeant l'électrode dans une solution d'iodure de potassium, concentration 10^{-2}M (figures 12 et 13).

Un résultat analogue aurait pu être obtenu en

FIG. 12

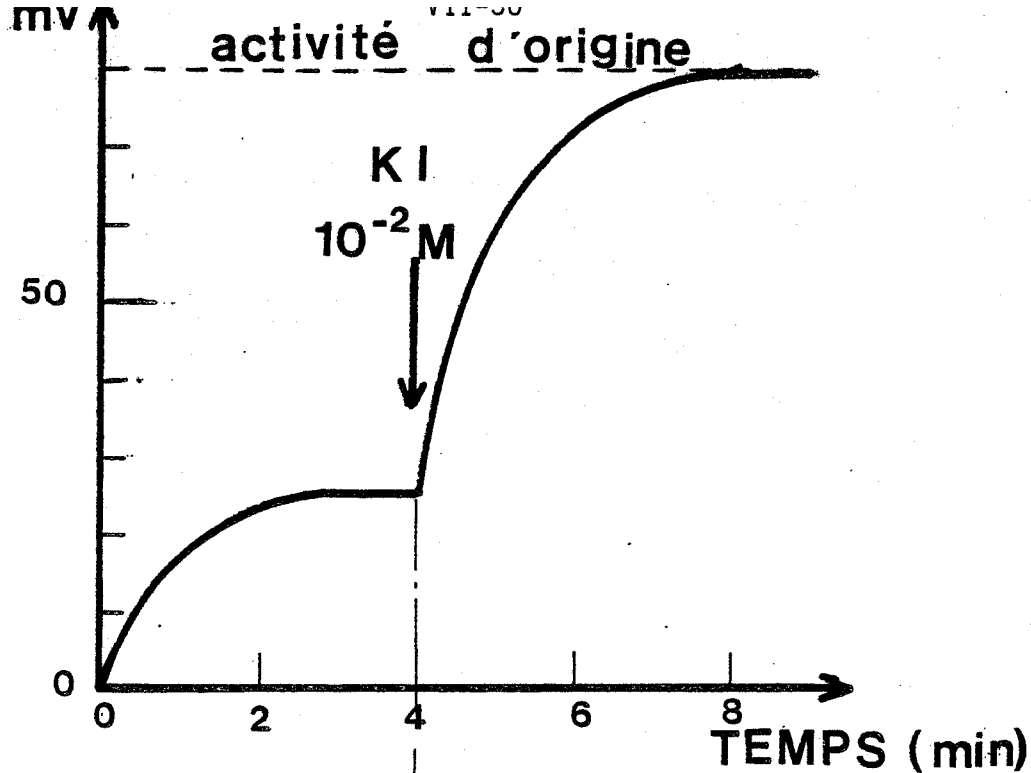


FIG. 13

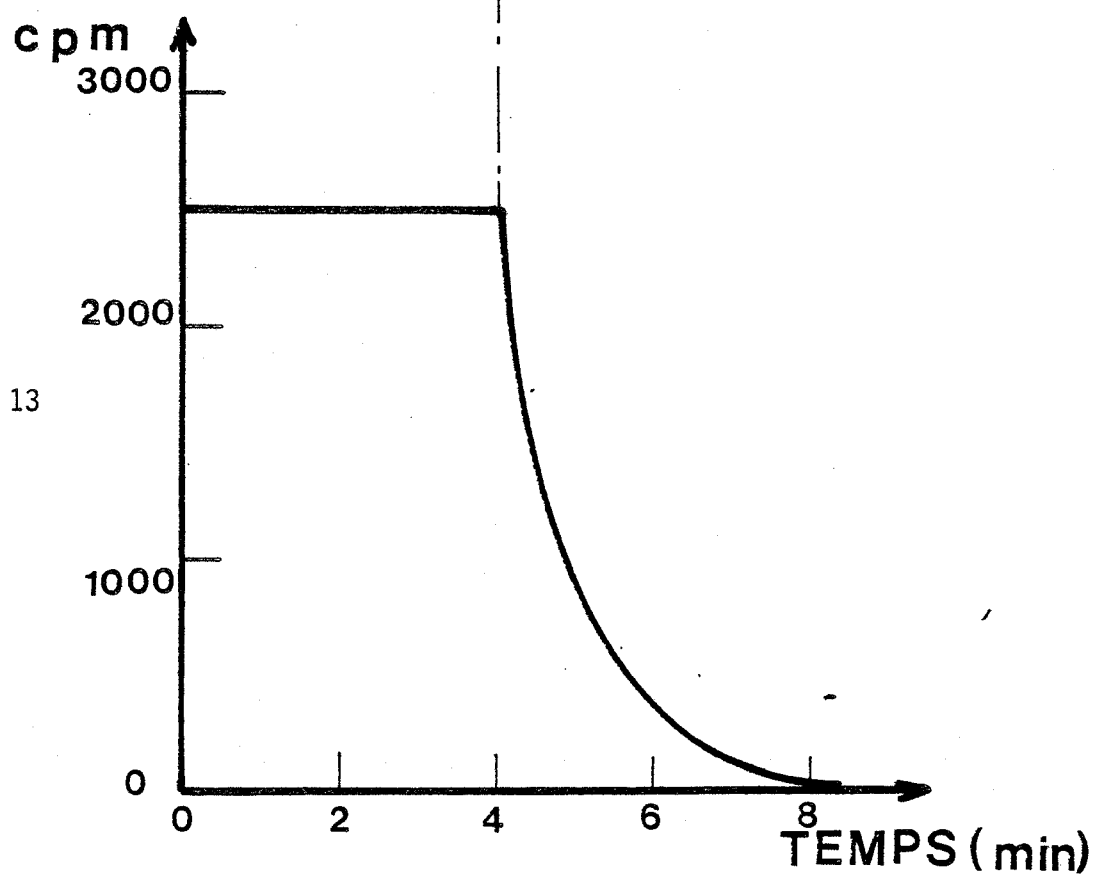


FIGURE 12 - Evolution de l'activité enzymatique d'une membrane à uréase inhibée par les ions Ag^+ après lavage par KI 10^{-2} M.

FIGURE 13 - Evolution correspondante de la radioactivité.

utilisant une solution de sulfure d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ de concentration 10^{-4}M .

δ) Régénération d'une membrane à uréase inhibée
par les ions Cu^{++}

L'étude de la régénération spontanée d'une membrane à uréase préalablement inhibée par les ions Cu^{++} (solution de sulfate de cuivre de concentration 10^{-2}M pendant 10 minutes) est analogue à celle conduite avec les ions Ag^+ .

La régénération spontanée est plus rapide (une journée environ). La courbe donnant l'évolution de l'activité enzymatique en fonction du temps est semblable à celle représentée - figure 10- pour les ions Ag^+ . La durée des phases est :

phase A-B : 30 minutes

phase B-C : 1 heure

phase C-D : une journée environ.

En utilisant une solution EDTA de concentration 10^{-1}M , pH = 7,0, on peut régénérer plus rapidement (2 à 3 minutes), et totalement la membrane. Une solution $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ de concentration 10^{-4}M , donne le même résultat.

ε) Régénération d'une membrane à uréase inhibée
par les ions Hg^{++}

L'étude de la régénération spontanée d'une membrane à uréase préalablement plongée dans une solution de chlorure mercurique, 10^{-6}M , contenant $0,05 \mu\text{Ci } ^{203}\text{Hg}$, pendant 10 minutes montre (figure 14 - figure 15) que :

- l'activité enzymatique chute presque immédiatement et celle-ci reste stable pendant plusieurs jours
- malgré un lavage continu, la radioactivité rémanente reste sensiblement constante au cours du temps.

La régénération spontanée est extrêmement longue et difficile. Le complexe formé entre l'enzyme et les ions mercuriques est

FIG. 14

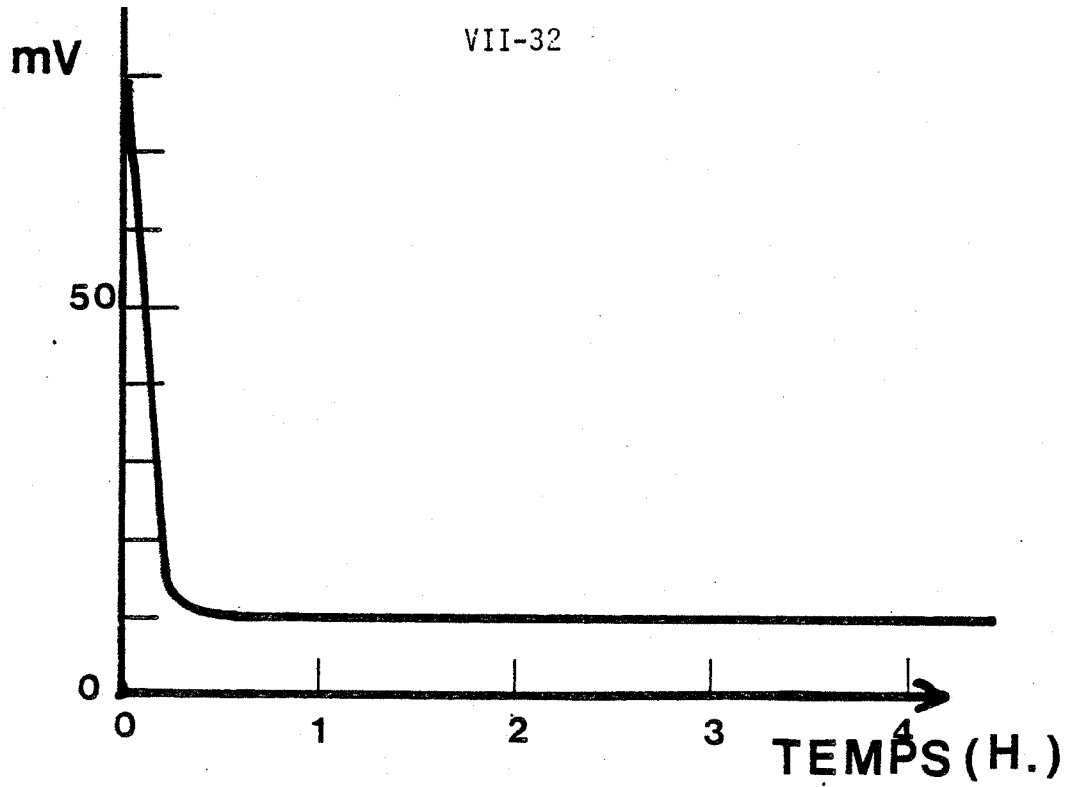


FIG. 15

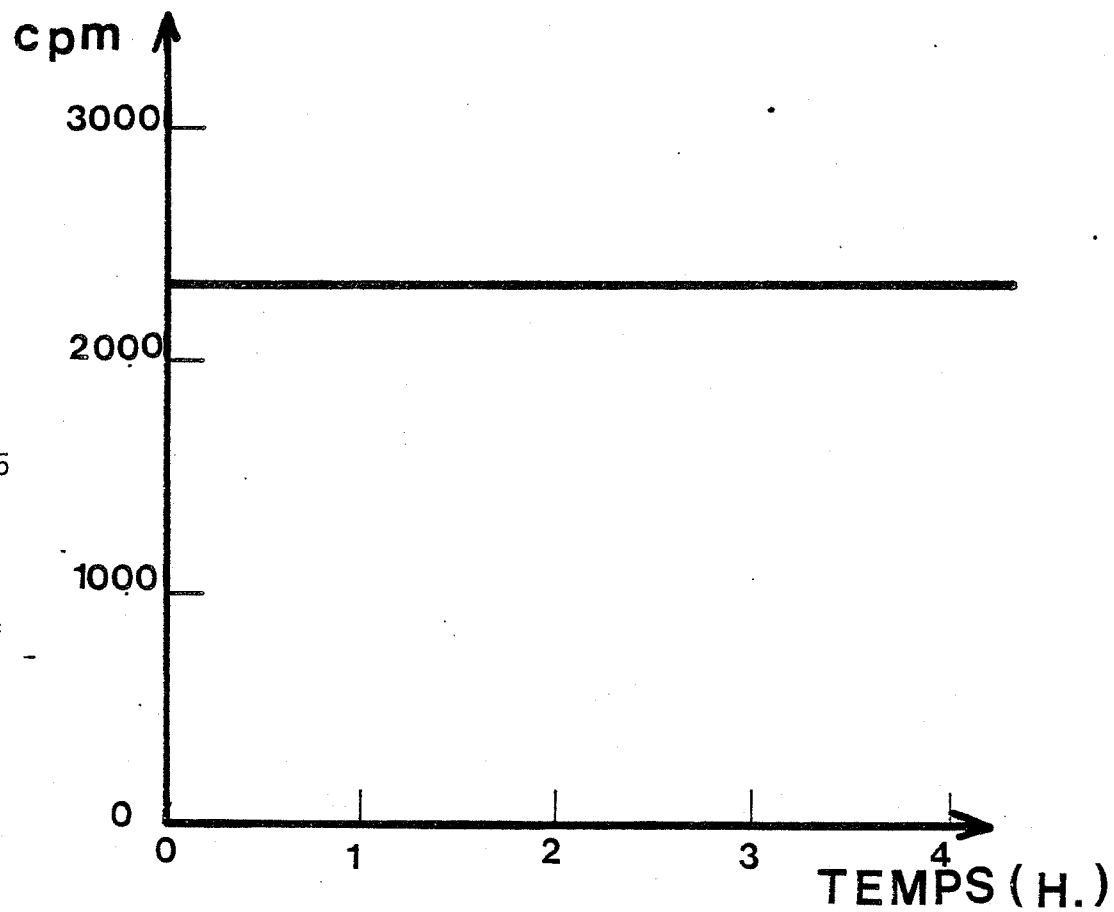


FIGURE 14 - Evolution de l'activité enzymatique d'une membrane à uréase inhibée par les ions Hg^{++} .

FIGURE 15 - Evolution correspondante de la radioactivité.

FIG. 16

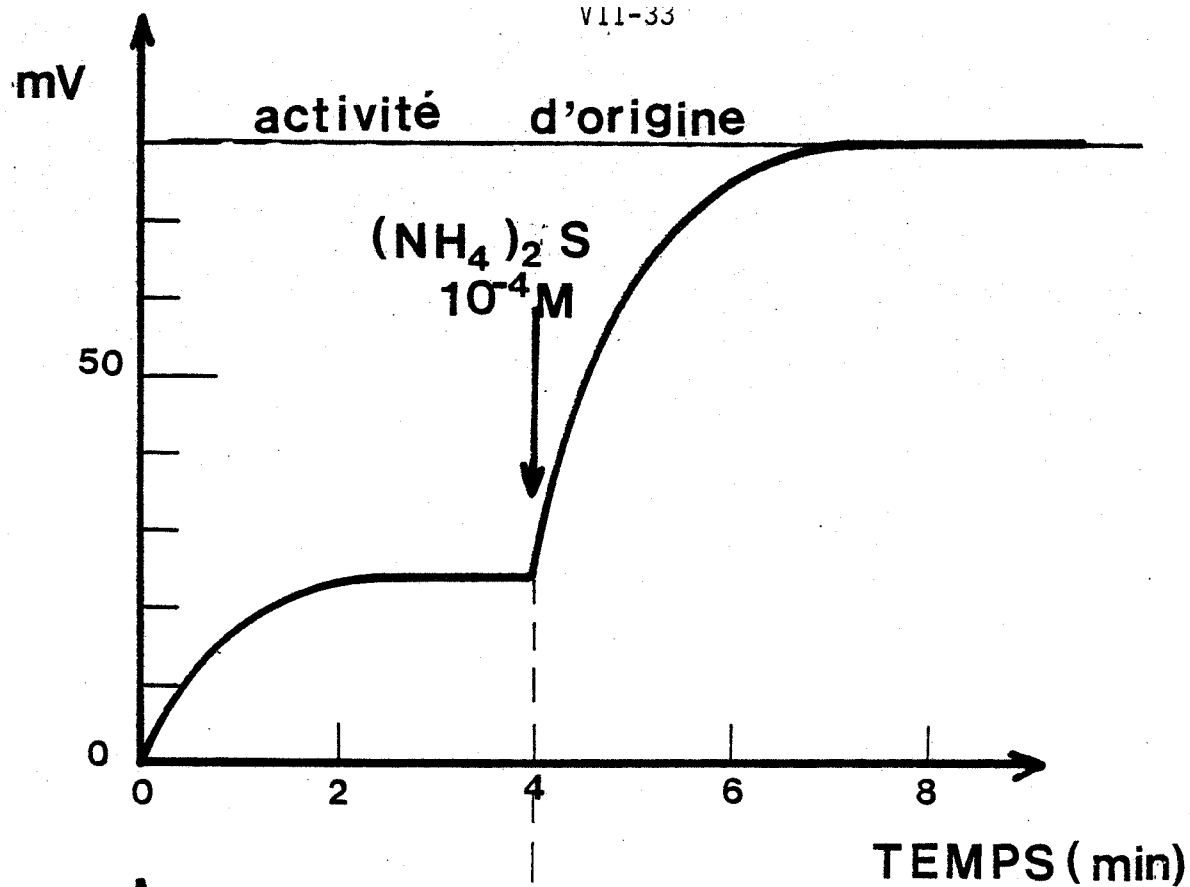


FIG. 17

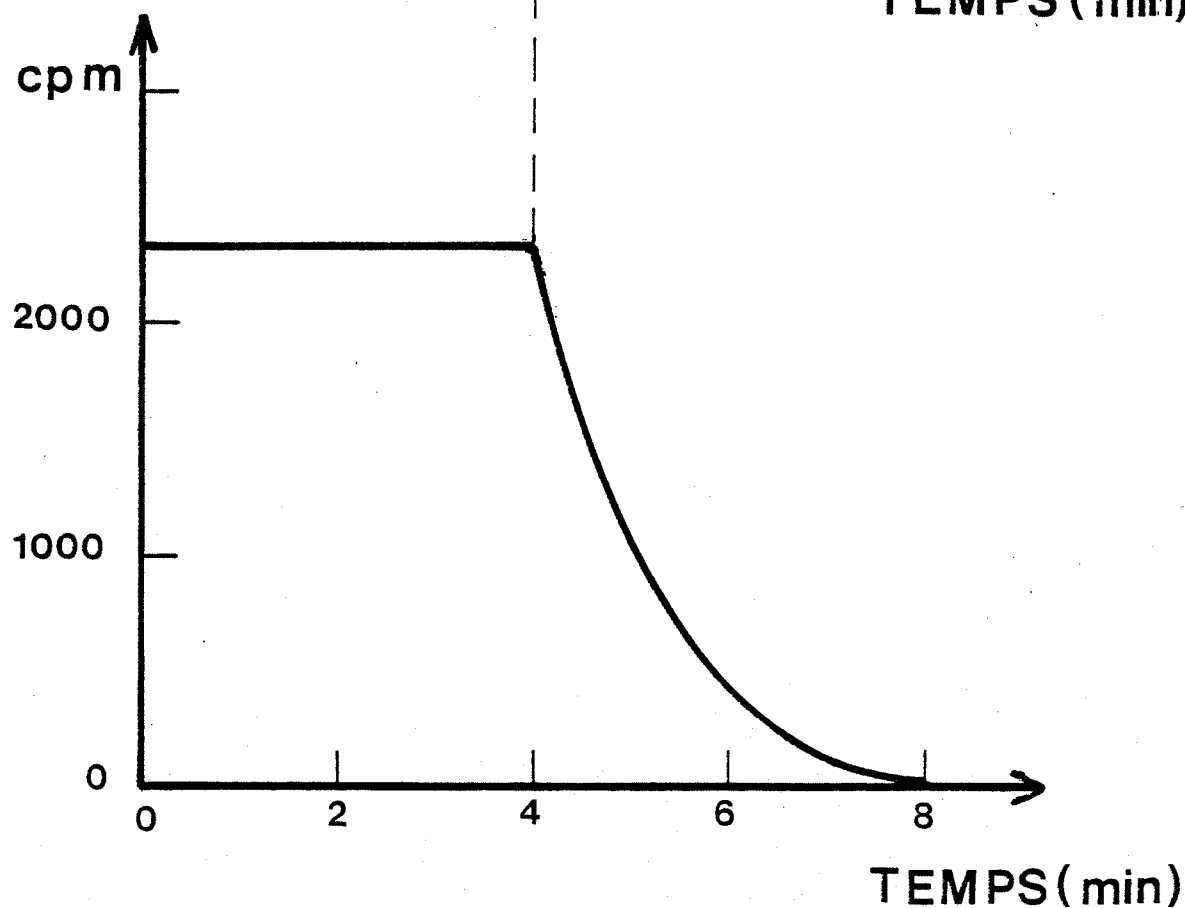


FIGURE 16 - Evolution de l'activité enzymatique d'une membrane à uréase inhibée par les ions Hg^{++} puis régénérée par $(\text{NH}_4)_2\text{S}$.

FIGURE 17 - Evolution correspondante de la radioactivité.

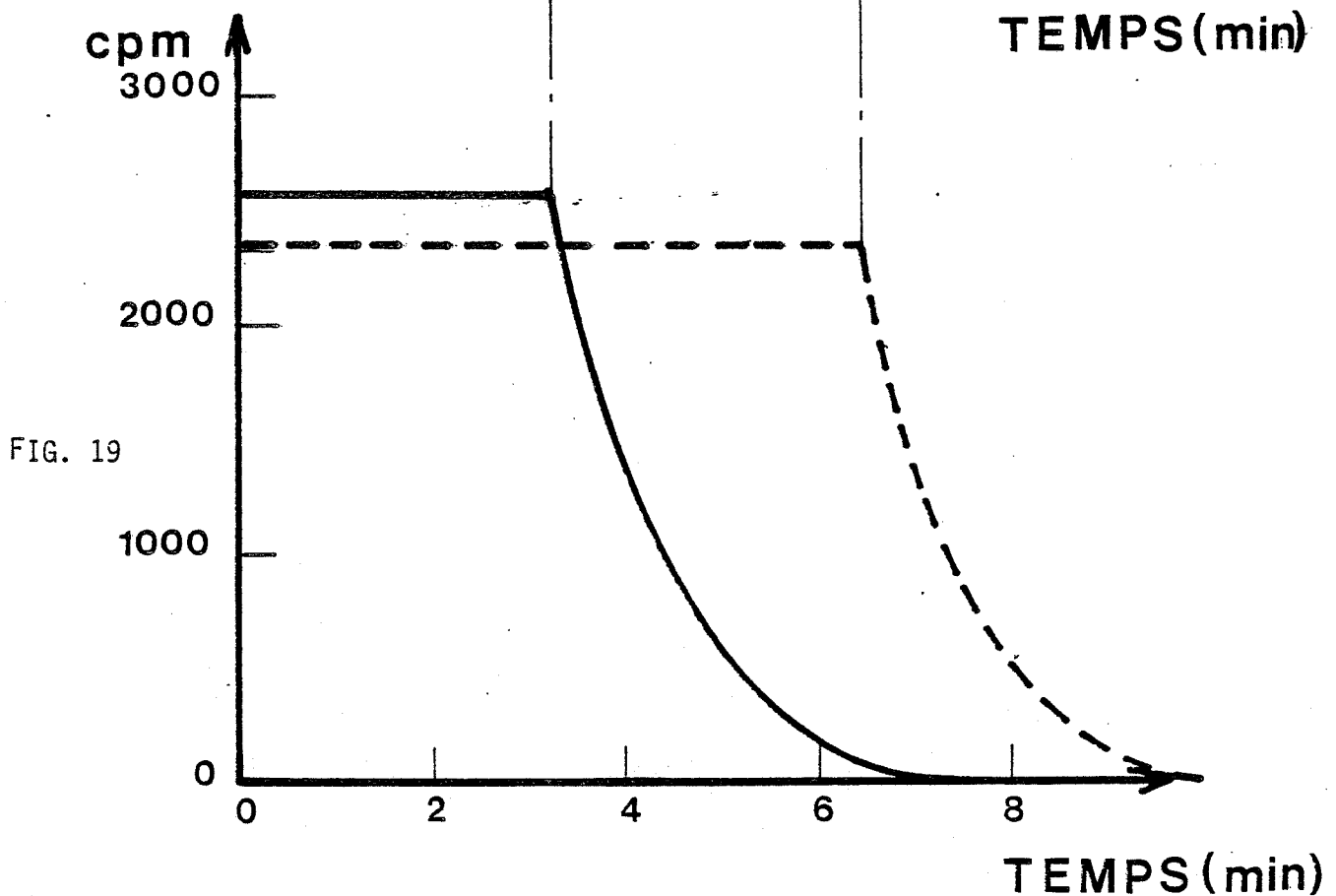
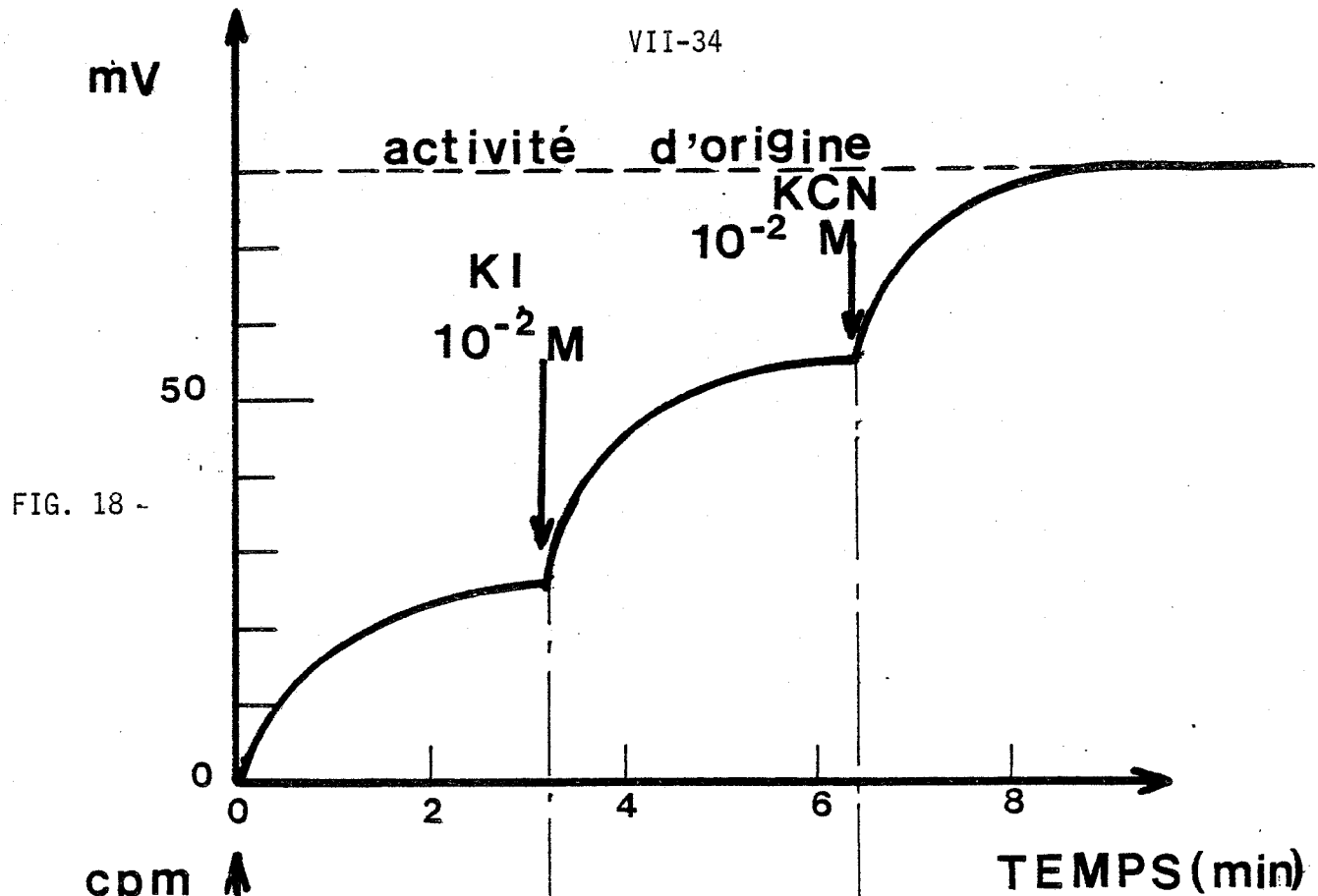


FIGURE 18 - Evolution de l'activité enzymatique d'une membrane à uréase inhibée par les ions Ag^+ et Hg^{++} . Influence de la régénération par KI puis KCN.

FIGURE 19 - Evolution correspondante de la radioactivité.

donc très stable.

Après l'essai de nombreux réactifs chimiques, nous avons obtenu une régénération artificielle rapide et efficace en utilisant $\text{KCN } 10^{-1} \text{ M}$ $\text{pH} = 7,0$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{S } 10^{-4} \text{ M}$. Les figures 16 et 17 mettent en évidence la régénération d'une membrane à uréase par $(\text{NH}_4)_2\text{S } 10^{-4} \text{ M}$ après inhibition par les ions Hg^{++} .

Conclusion : Contrairement à $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, les régénérateurs tels que KI pour les ions Ag^+ , KCN pour les ions Hg^{++} , EDTA pour les ions Cu^{++} , sont spécifiques à chaque ion. Ainsi une électrode inhibée préalablement par les ions Ag^+ et Hg^{++} , peut être régénérée spécifiquement en utilisant l'une puis l'autre des substances régénérantes citées plus haut (figure 18 - figure 19).

e) Inhibition et régénération de l'acétylcholinestérase immobilisée

La régénération d'une membrane à acétylcholinestérase immobilisée a été conduite dans notre laboratoire [R. GUYONNET - Thèse -1978]. L'enzyme est inhibée par le paraoxon, organophosphoré d'un pouvoir inhibiteur élevé, qui peut être repéré par le phosphore 32, utilisé en tant que radiotraceur.

Celui-ci se décompose en émettant des particules β très énergétiques (1710 KeV). L'utilisation de l'effet CERENKOV permet de mesurer la radio-activité de la membrane.

Les inhibitions avec iodure d'écothiopate et éserine sont réversibles spontanément sur des périodes longues (plusieurs jours). Par contre, celles dues aux organophosphorés, tels que le paraoxon, méthyl ou ethyl parathion sont très difficilement réversibles spontanément.

Les organo-phosphorés tels que tabum, sarin, parathion, malathion, paraoxon, ont une structure du type :

FIG. 20

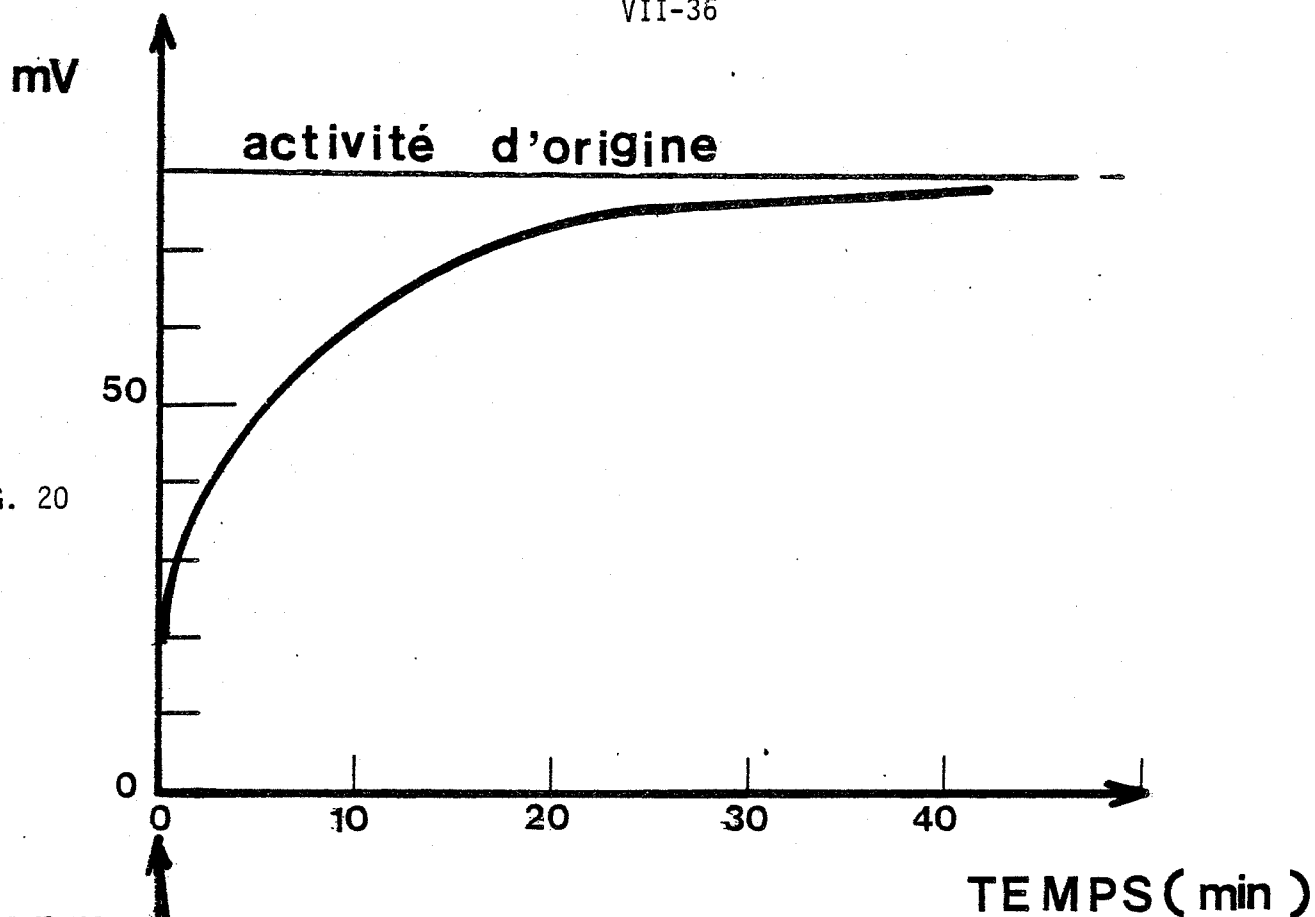


FIG. 21

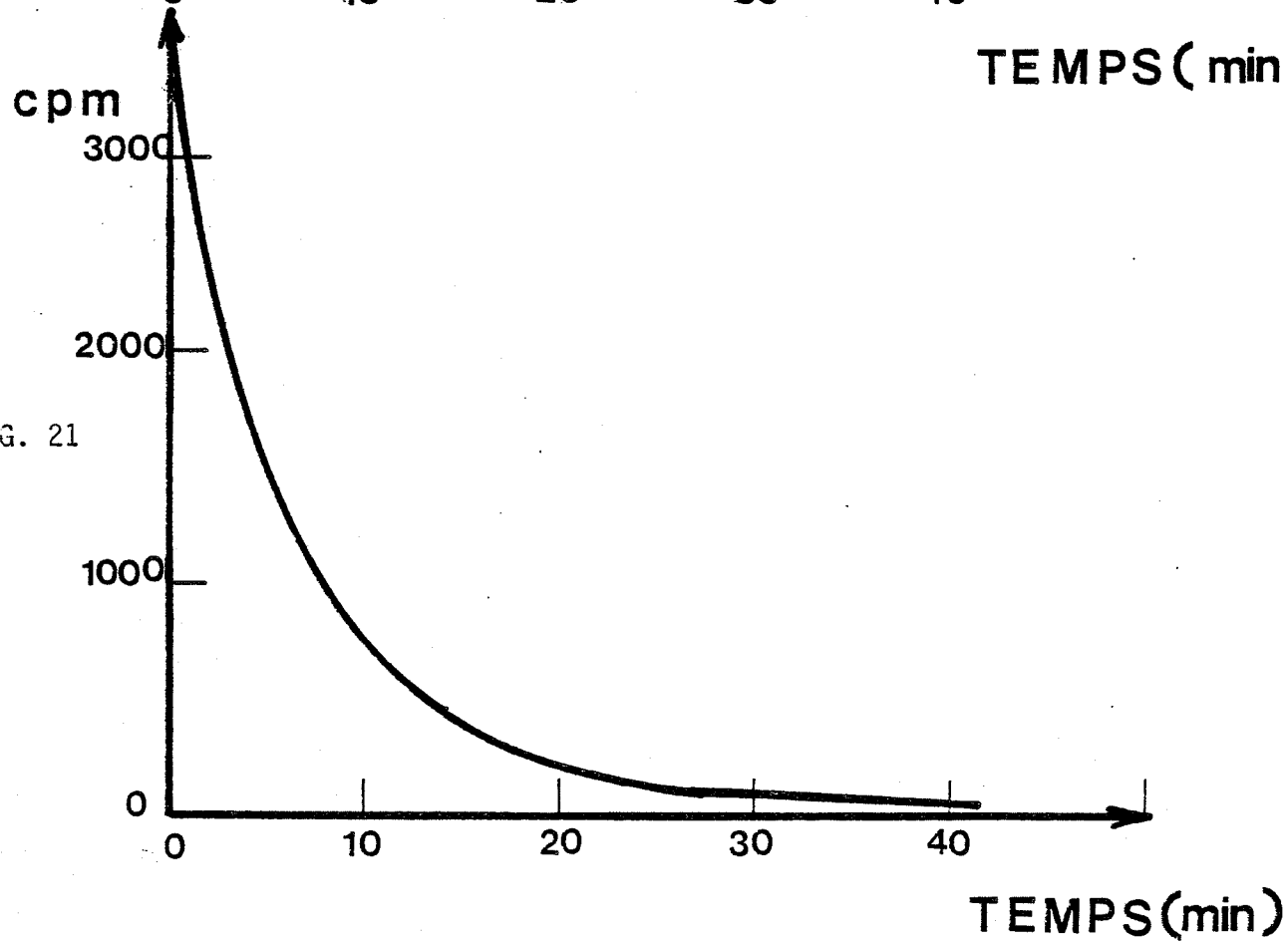
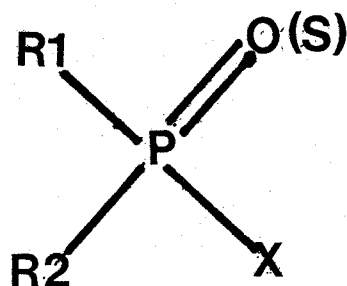


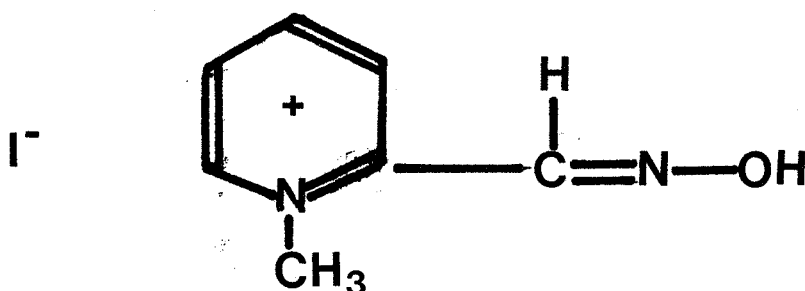
FIGURE 20 - Régénération par la PAM 10^{-4} M pH = 7,40 d'une membrane à acétylcholinestérase préalablement inhibée par du paraoxon, incubée 5 minutes.

FIGURE 21 - Evolution correspondante de la radioactivité.



Si nous voulons éliminer de telles substances, il convient d'attaquer l'atome de phosphore à l'aide d'agents plus nucléophiles, qui vont le détacher de l'enzyme. L'hydroxylamine trouvée par IRWIN WILSON [I.B. WILSON - 1952] n'est efficace qu'à haute concentration.

Nous nous sommes orientés vers une substance contenant un groupement ammonium quaternaire [E.J. POZOMEK - 1958]. Le plus efficace est l'iodure de méthyl-pyridine aldoxime dite PAM de formule :



Ce produit a été testé par CHILDS et COLL [A.F. CHILDS 1955] comme antidote chez le rat, contre l'empoisonnement par les organo-phosphorés. Comme le montrent les figures 20 et 21, la régénération de la membrane à acétylcholinestérase inhibée par le paraoxon est particulièrement efficace. La PAM s'est révélée être une substance régénérante efficace pour la quasi totalité des inhibiteurs que nous avons étudiés, à savoir l'iodure d'écothiopate, l'éserine, le paraoxon, le méthyl et ethyl parathion.

Pour tous les essais réalisés ultérieurement, nous utiliserons une solution de PAM, 10^{-1}M , afin d'accélérer la régénération des membranes enzymatiques. Le temps mis pour atteindre l'état stationnaire initial est alors de 4 à 5 minutes (figure 22).

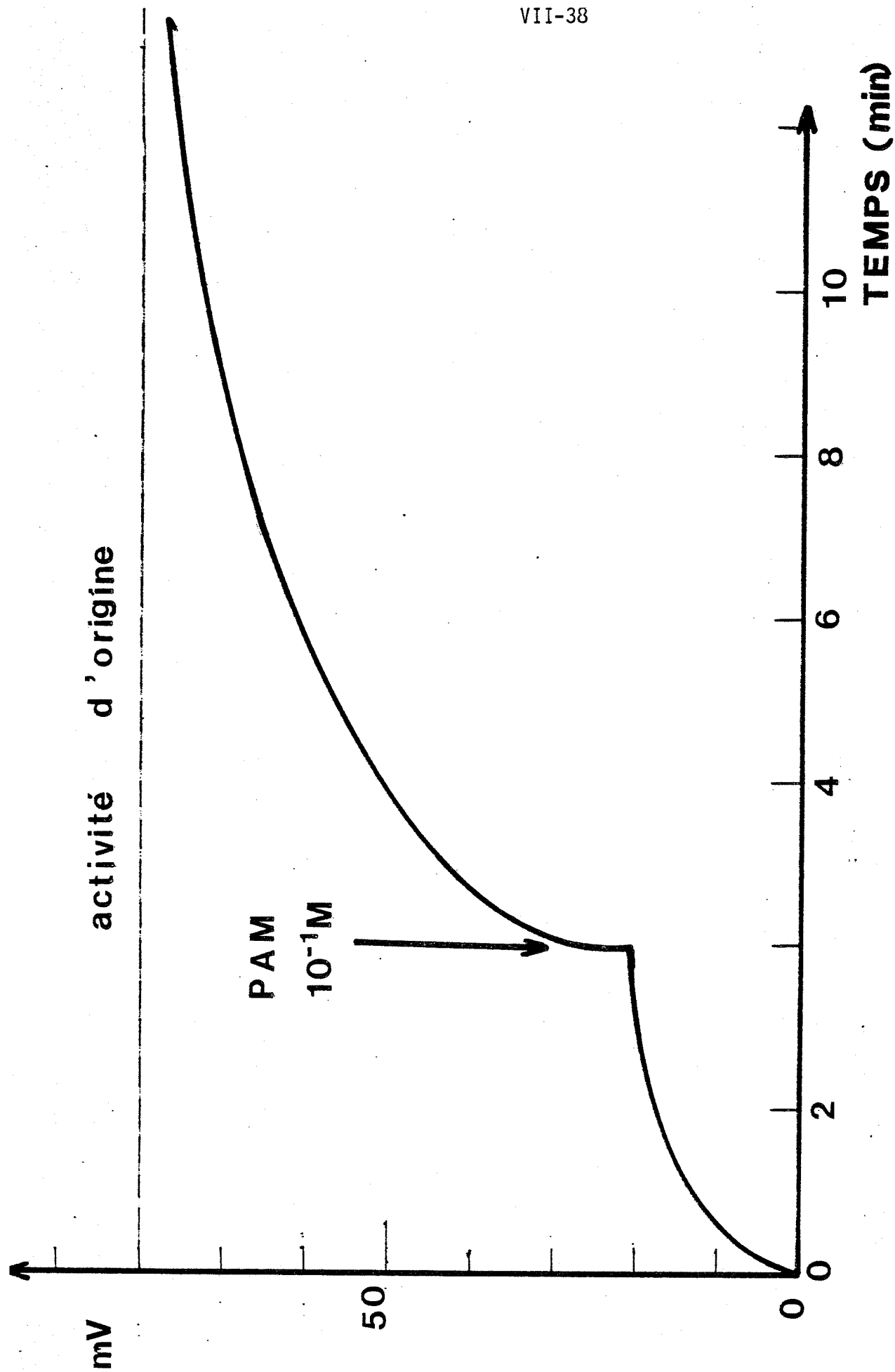


FIGURE 22 - Régénération d'une membrane à acétylcholinestérase inhibée par l'iodure d'écothiopate (10^{-8} M - 10 minutes, température ambiante) au moyen d'une solution PAM, pH = 7,0 de concentration 10^{-1} M.

2) MATERIELS ET METHODES

Nous avons vu précédemment que les enzymes peuvent être inhibées de différentes façons (compétitive, anti-compétitive, non compétitive, et parfois mixte). Les différents types d'inhibition seront étudiés cas par cas dans l'étude expérimentale.

a) Inhibition compétitive et anti-compétitive

L'électrode enzymatique fabriquée est testée en l'absence de tout inhibiteur pour une concentration en substrat S_0 dans la phase aqueuse.

Lorsque l'état stationnaire est atteint, une concentration de plus en plus importante en inhibiteur est rajoutée ; la réponse de l'électrode diminue et atteint un nouvel état stationnaire.

La méthode est reprise pour différentes valeurs de concentrations en substrat dans la phase aqueuse.

b) Inhibition non-compétitive

Compte tenu de la difficulté de se procurer commercialement des inhibiteurs du type purement non-compétitifs (acide sorbylhydroxamique, acide glutarylmonohydroxamique, ... [G.R. GALE - 1969]), la méthode de travail que nous proposons s'inspire des conclusions du paragraphe II-2-j chapitre VII de cette étude :

- l'inhibiteur non réversible immédiatement est mis en contact avec la membrane contenant l'enzyme immobilisée pendant un temps T dit "temps d'incubation". Cet inhibiteur bloque un certain nombre de sites enzymatiques diminuant, en conséquence, l'activité de la membrane enzymatique.
- l'électrode enzymatique est rincée abondamment afin d'éliminer au maximum la présence de l'inhibiteur au sein de la membrane. L'électrode est alors testée pour différentes valeurs de concentration en substrat

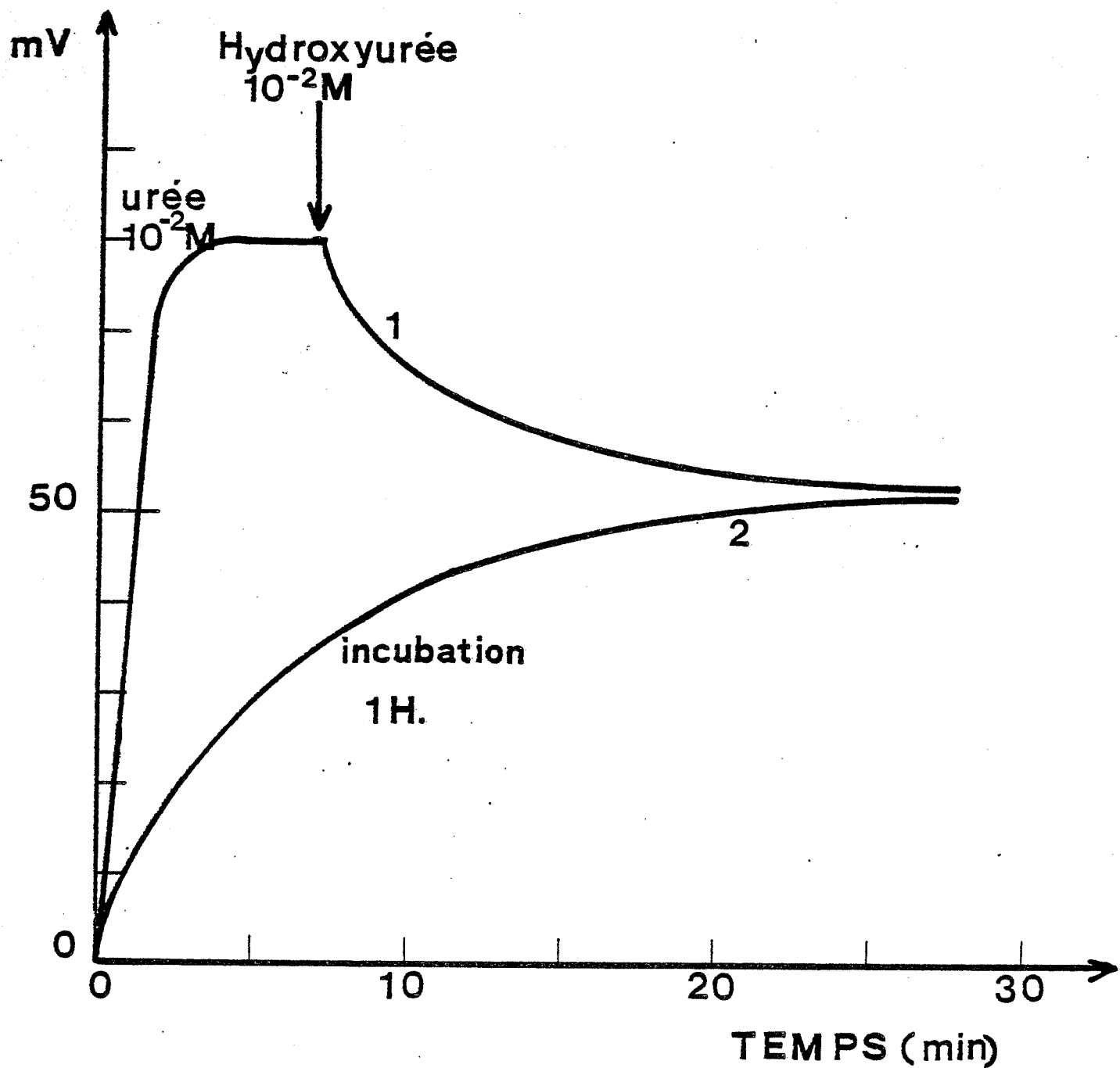


FIGURE 23 - Comportement analogue de l'électrode à uréase vis-à-vis de l'hydroxyurée.

(1) sans incubation préalable

(2) avec incubation préalable, pendant 1 heure en présence d'hydroxyurée.

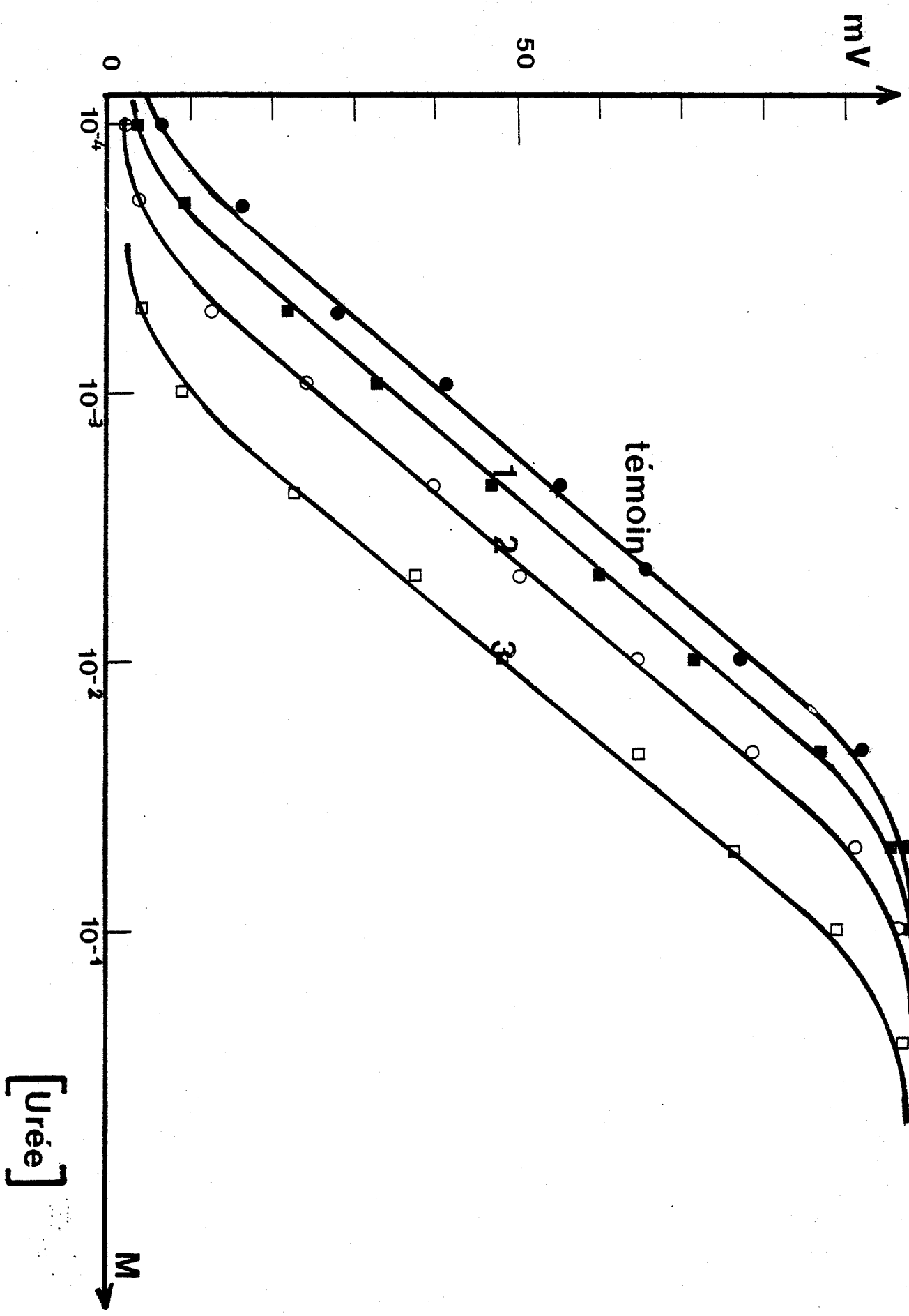


FIGURE 24 - Réponse d'une électrode à uréase en fonction de la concentration en urée pour des concentrations en hydroxyurée: (1) $2.10^{-3}M$; (2) $5.10^{-3}M$; (3) $2.10^{-2}M$.

S_0 dans la phase aqueuse.

- la membrane est régénérée en utilisant la substance régénératrice appropriée à l'inhibiteur employé, et dont la mise au point a été réalisée au cours du chapitre précédent.

3) RESULTATS ET DISCUSSIONS

a) Inhibition compétitive

Les inhibiteurs que nous avons utilisés sont :

- pour les membranes à uréase :
 - . thiourée
 - . phénylurée
 - . hydroxyurée
- pour les membranes à acétylcholinestérase :
 - . nicotine
 - . arginine.

Nous avons constaté que :

- l'inhibition est parfaitement réversible, bien que parfois l'action d'un inhibiteur soit relativement lente.
- le temps d'incubation inhibiteur-enzyme n'a aucune influence sur l'état stationnaire final obtenu (figure 23 - cas hydroxyurée uréase).

En portant en ordonnée la réponse du capteur en fonction du logarithme de la concentration en substrat dans la phase aqueuse S_0 , pour différentes concentrations en inhibiteur, nous avons obtenu le réseau de courbes -figure 24-. Les courbes de réponse ont des parties linéaires sensiblement parallèles. Pour des valeurs S_0 élevées, les courbes admettent le même plateau de réponse.

Ces résultats sont conformes à ceux de la théorie mathématique développée chapitre VII paragraphe II-2-b de cette étude.

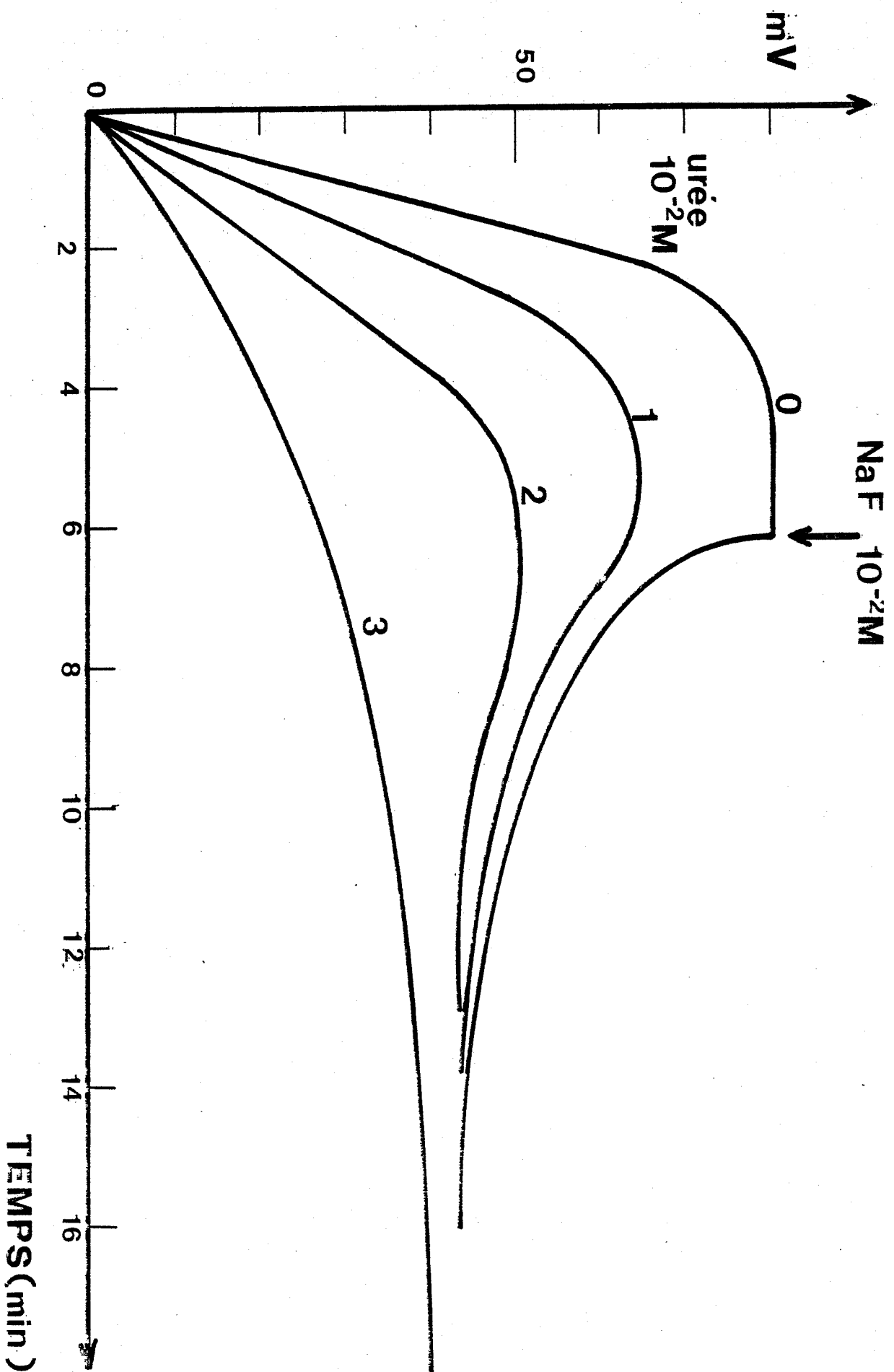


FIGURE 25 - Similitude des états stationnaires obtenus

- (0) en présence de NaF 10^{-2} M sans incubation préalable - (1) après un temps d'incubation = 1 heure
 (2) après un temps d'incubation = 1 jour
 (3) après un temps d'incubation = 4 jours
 pour une concentration en urée égale à 10^{-2} M.

Remarque : Nous appellerons temps d'inhibition, le temps pendant lequel l'enzyme est en contact avec l'inhibiteur.

Pour certains inhibiteurs, tels la thiourée ou la phénylurée, l'inhibition est lente - 4 à 5 heures avant d'atteindre le nouvel état stationnaire.

Aussi, afin d'obtenir plus rapidement les résultats, avons-nous fixé pour toutes nos mesures, un temps d'inhibition T_0 où ont été effectués tous nos relevés concernant la réponse de l'électrode.

b) Inhibition anti-compétitive

Concernant l'uréase et l'acétylcholinestérase, seuls les ions fluorures sont apparus comme présentant une inhibition du type purement anti-compétitif [G. CIMASONI - 1966] [G. CIMASONI - 1969]. L'utilisation de la méthode de LINEWEAVER - BURK, en phase homogène, nous a permis de vérifier ce résultat. Les droites obtenues sont bien parallèles et dans le cas de l'uréase, la constante d'inhibition a pu être estimée :

$$K_I(\text{uréase}) = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$$

Nous avons accompli un important travail sur l'étude de l'inhibition de l'uréase par les ions fluorures en phase hétérogène, résultats dont la concordance avec l'étude mathématique a permis une extension aux autres systèmes d'inhibition.

α) Etude de la réponse de l'électrode

Les études que nous avons entreprises montrent que l'inhibition est parfaitement réversible et que le temps d'incubation ions fluorures-enzyme n'a aucune influence sur l'état stationnaire final (figure 25).

En portant en ordonnée la réponse du capteur en fonction du logarithme de la concentration en substrat dans la phase aqueuse, le réseau de courbes obtenues figure 26, met en évidence une similitude avec les résultats théoriques obtenus chapitre VII paragraphe II-2-c

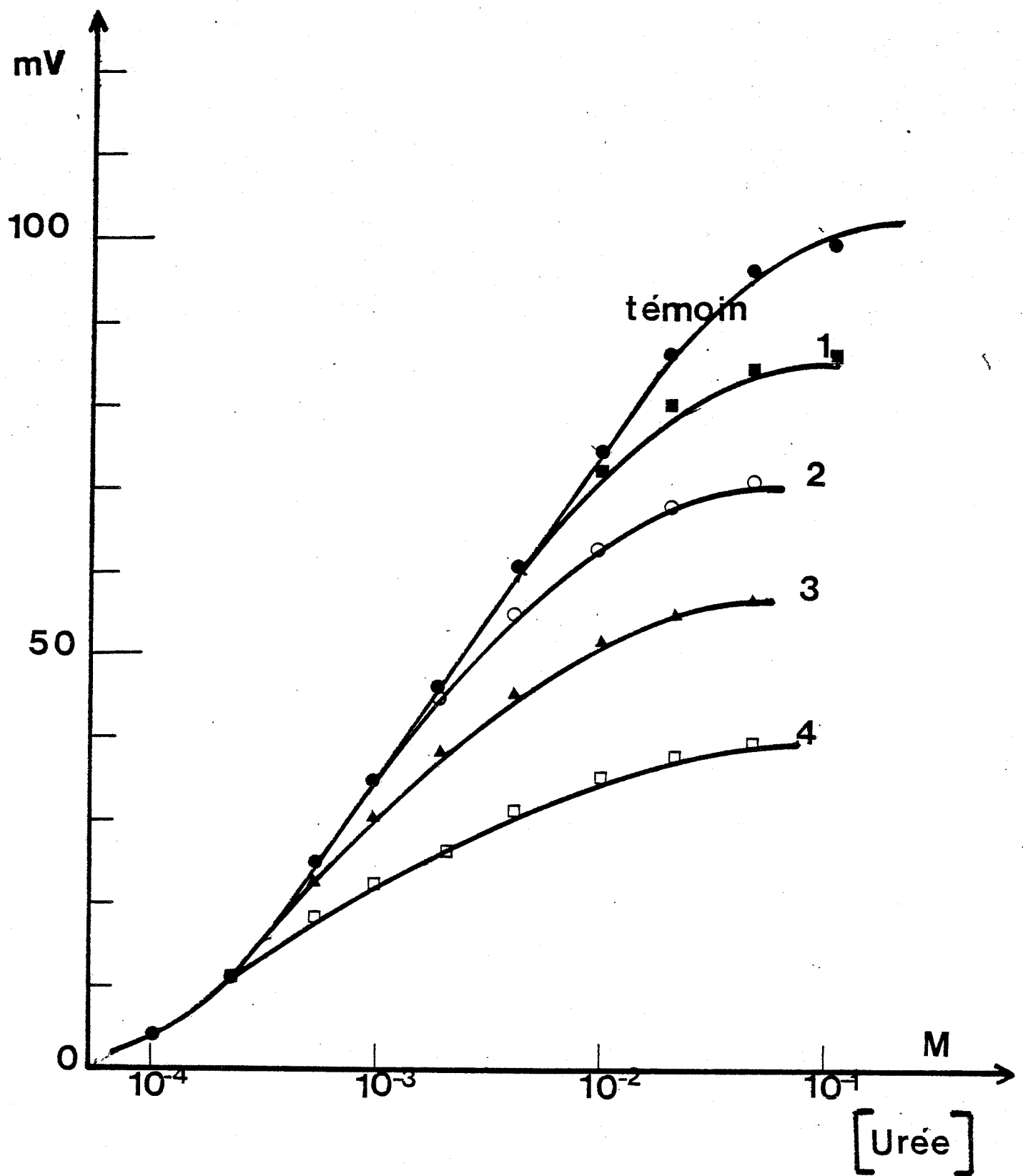


FIGURE 26 - Réponse de l'électrode à uréase en fonction de la concentration en urée pour différentes concentrations en ions F^-
 (1) $3 \cdot 10^{-4}$ M ; (2) $5 \cdot 10^{-4}$ M ; (3) 10^{-3} M ; (4) $3 \cdot 10^{-3}$ M.

cette même étude.

b) Courbe pourcentage d'inhibition
Système uréase-ions fluorures

L'étude concernant les courbes pourcentage d'inhibition a été conduite sur le système uréase-ions fluorures étant donné qu'il était facile de mesurer la valeur de $[CO_2]$ à l'interface interne membrane enzymatique, électrode.

La courbe expérimentale obtenue figure 27 met en évidence l'existence d'une partie linéaire et d'un plateau lorsque la concentration en inhibiteur augmente.

Si nous traçons les courbes pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur, pour différentes concentrations en substrat, les parties linéaires sont sensiblement parallèles, résultat conforme à la théorie mathématique chapitre VII paragraphe II-2-h, et sont d'autant déplacées vers la droite que la concentration en inhibiteur est élevée (figure 28).

Nous avons également étudié l'influence de l'activité de la membrane enzymatique sur l'inhibition. Plusieurs moyens étaient à notre disposition :

- augmenter la quantité d'enzyme au sein de la membrane lors de la fabrication de celle-ci
- réduire le pouvoir dénaturant de l'agent pontant, c'est-à-dire diminuer la quantité d'aldéhyde glutarique
- diminuer le temps de réticulation, donc le temps de contact enzyme-aldéhyde glutarique.

Les résultats obtenus dans les trois cas (figures 29 - 30 - 31) sont analogues ; la courbe pourcentage d'inhibition est d'autant déplacée vers la droite, donc vers les concentrations en inhibiteur élevées que :

- la quantité d'enzyme fixée est importante
- la quantité d'aldéhyde glutarique rajoutée

%
d'inhibition

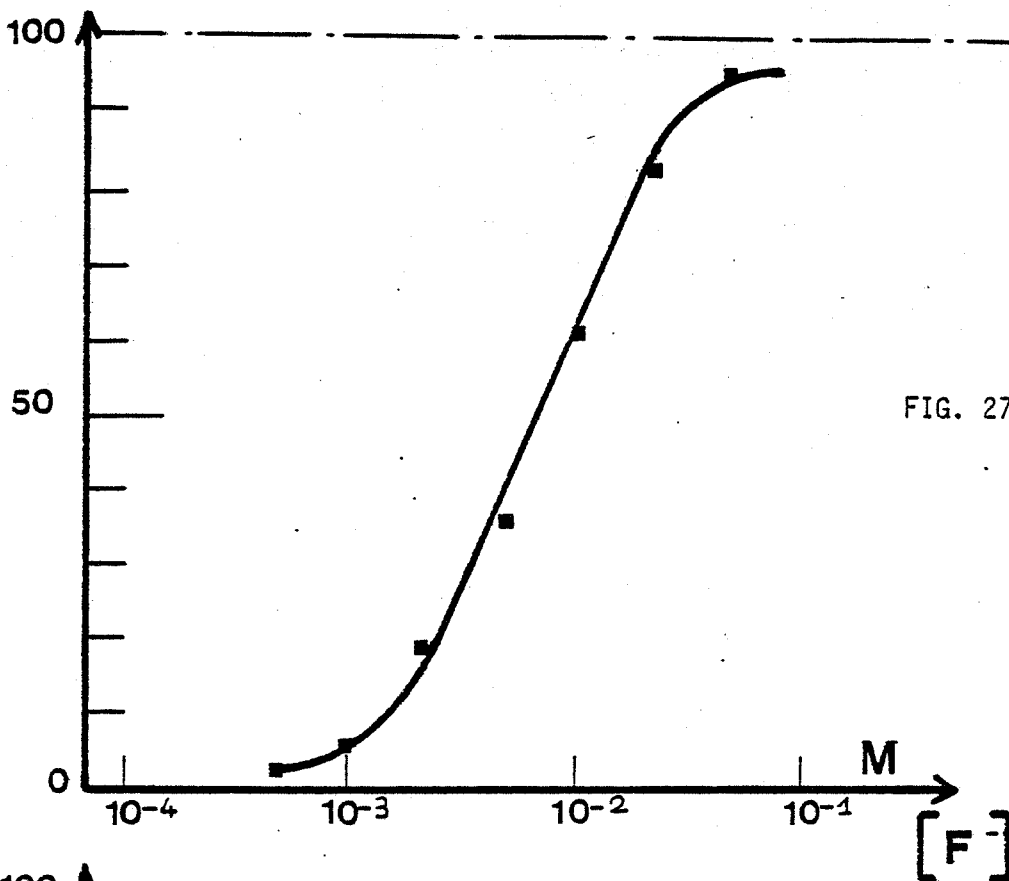


FIG. 27

%
d'inhibition

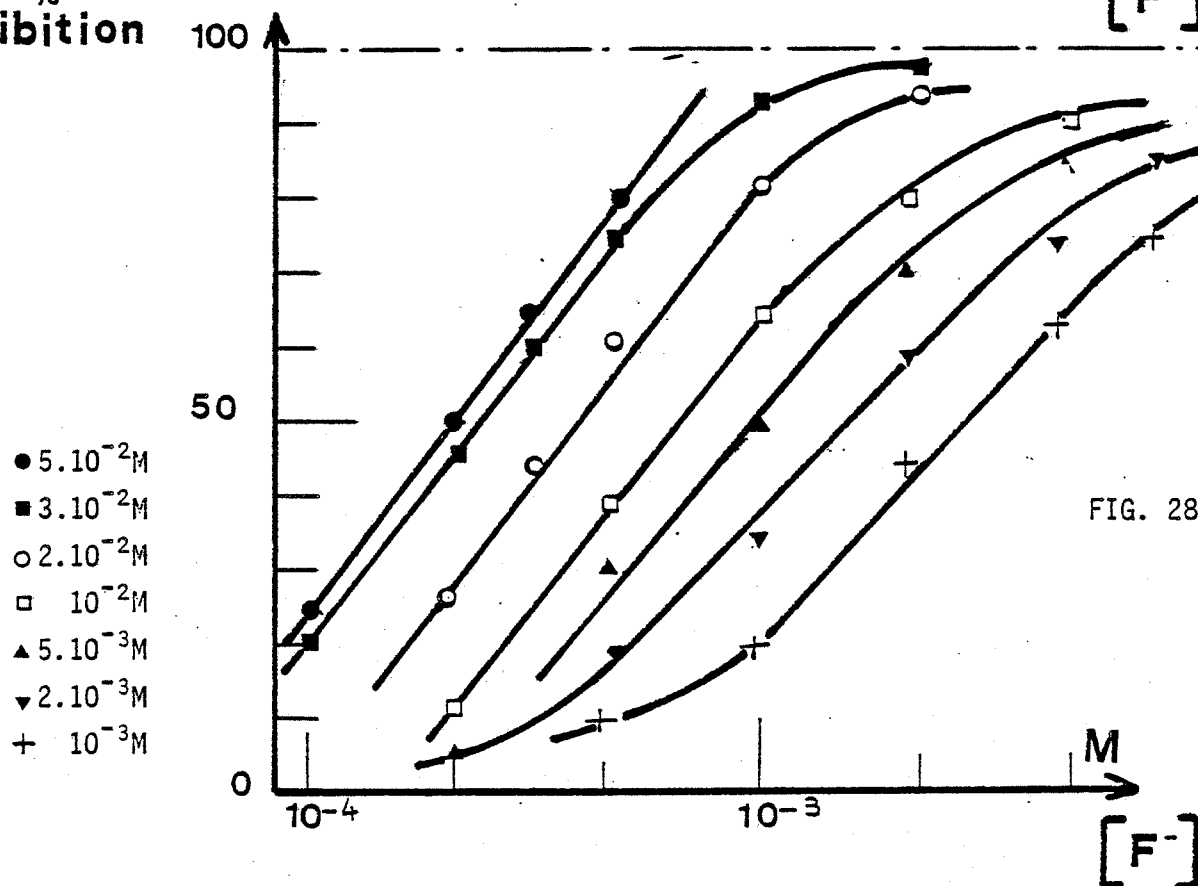


FIG. 28

FIGURE 27 - Pourcentage d'inhibition observée en fonction de la concentration en ions fluorures pour une concentration en urée égale à $10^{-2} M$.

FIGURE 28 - Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ions fluorures pour différentes concentrations en urée.

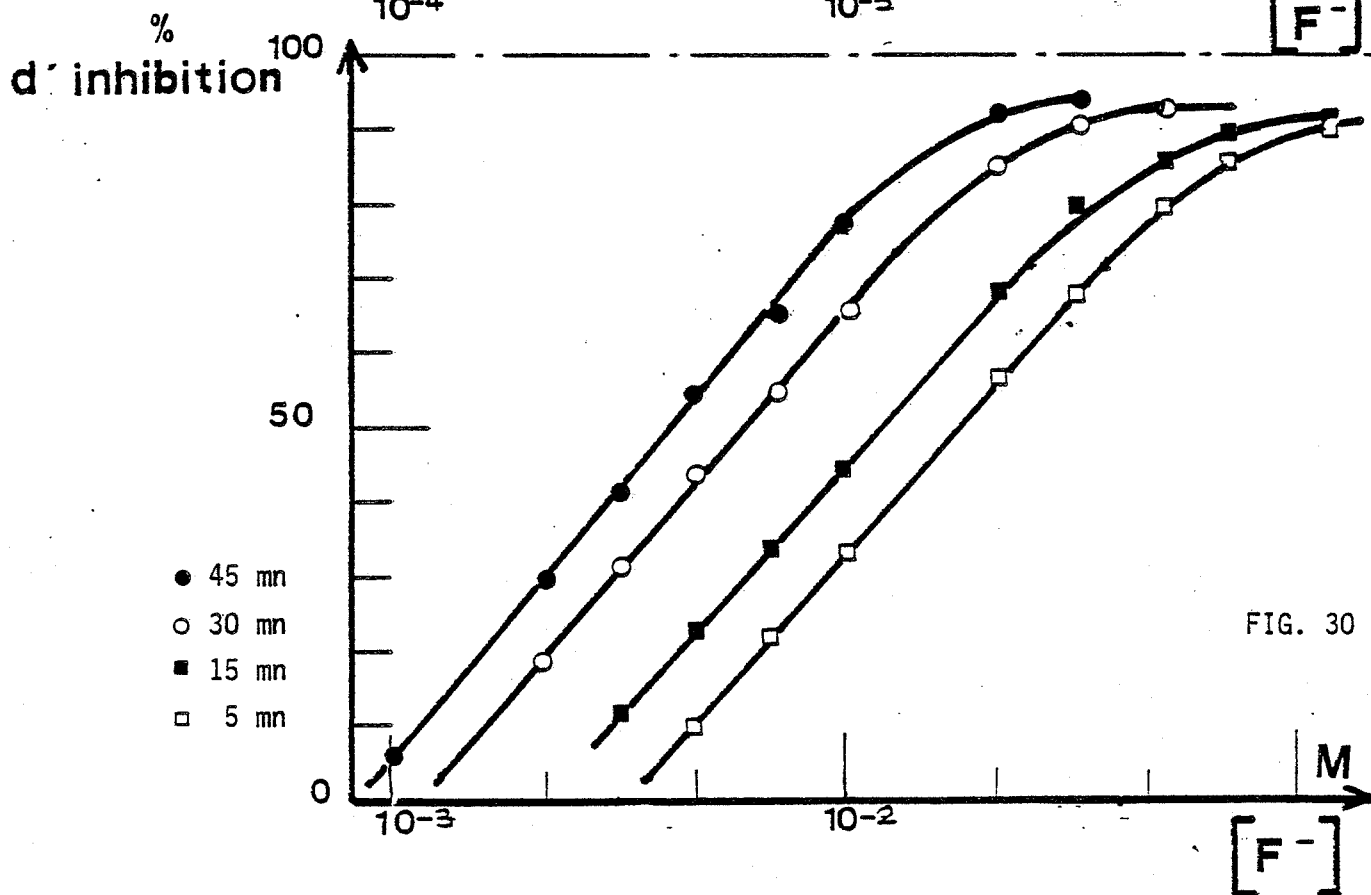
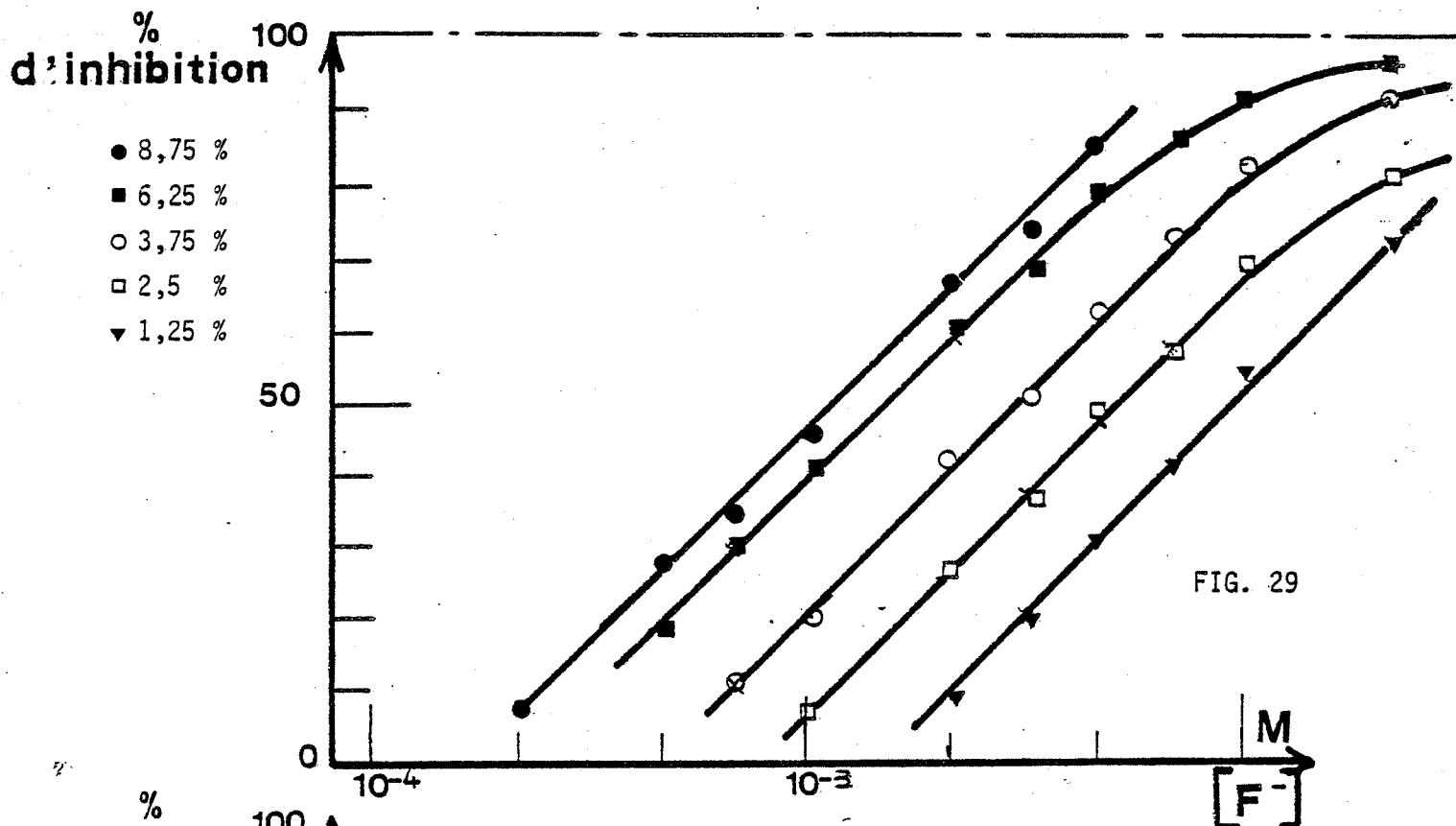
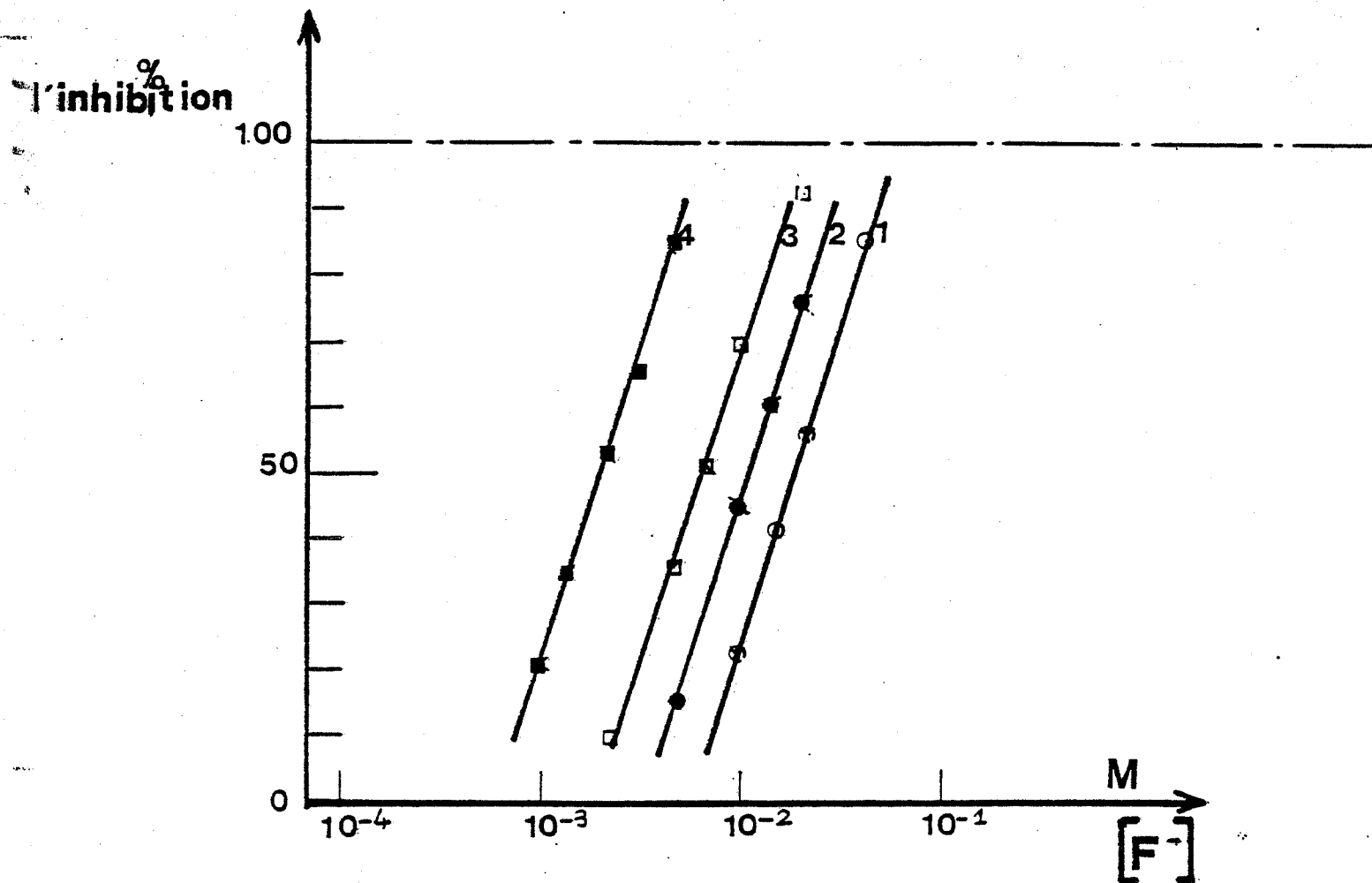


FIGURE 29 - Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ions fluorures pour différents pourcentages d'aldéhyde glutarique.

FIGURE 30 - Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ions fluorures pour différents temps de réticulation.



- (1) 1 U/ μ l
- (2) 0,5 U/ μ l
- (3) 0,2 U/ μ l
- (4) 0,05 U/ μ l

FIGURE 31 - Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ions fluorures pour différentes concentrations d'urée dissoute.

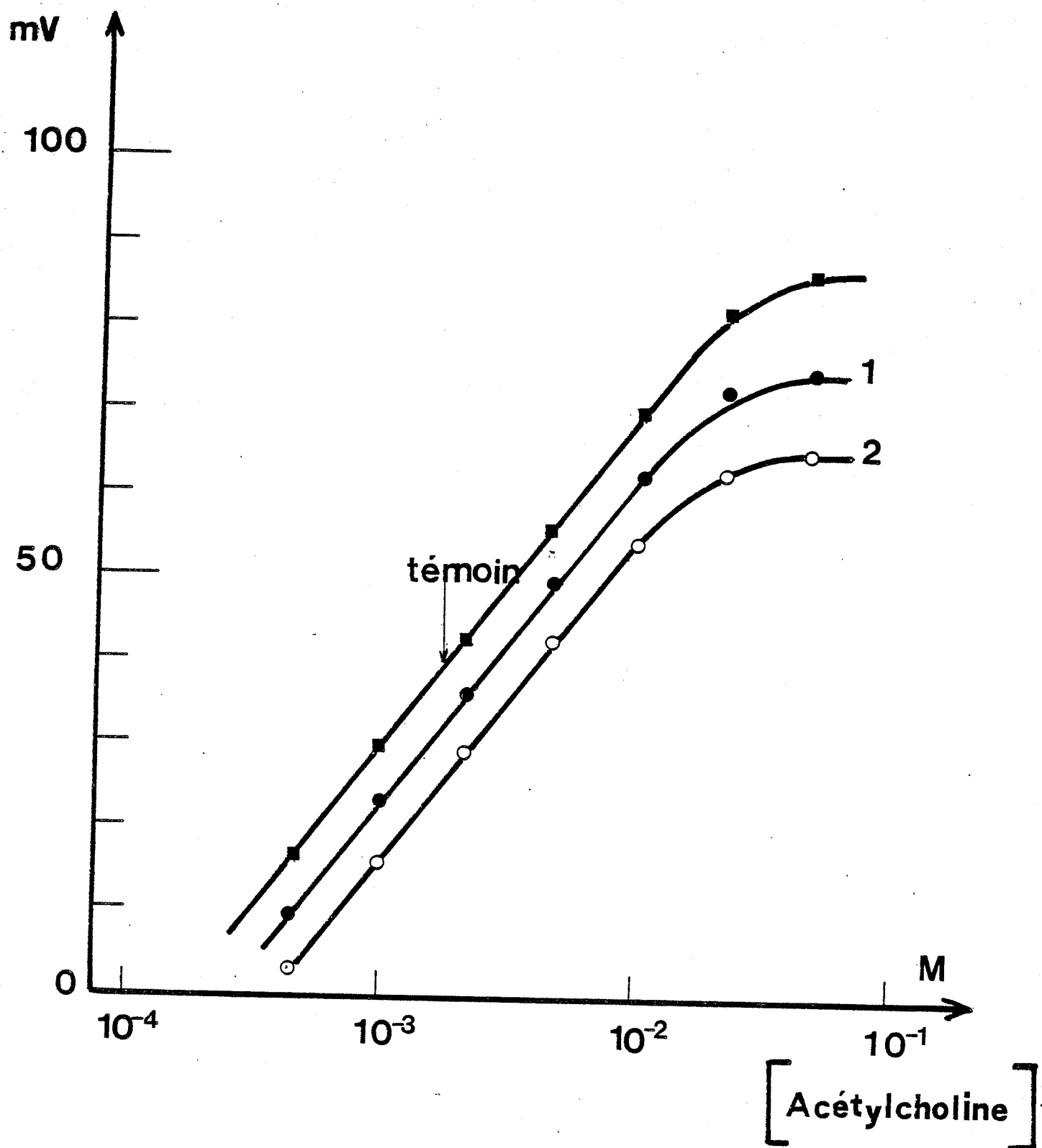


FIGURE 32 - Réponse d'une électrode à AChE en fonction de la concentration en acétylcholine pour différentes concentrations en ions Hg^{++}
 (1) = $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$; (2) = 10^{-4}M

est faible

- le temps de réticulation est faible, soit lorsque l'activité de la membrane enzymatique est plus importante. Ce résultat est conforme à celui obtenu chapitre VII, paragraphe II-2-i de cette étude.

c) Inhibition non-compétitive

Compte tenu de la remarque formulée au chapitre VII, paragraphe II-2-j de cette étude, nous avons procédé à une incubation de l'enzyme réticulée en présence de l'inhibiteur pendant un temps donné, suivi d'un rinçage (voir méthode exposée au paragraphe III-2-b de cette étude).

Parmi les inhibiteurs que nous avons testés, citons :

- pour l'uréase : les ions Ag^+ , Hg^{++} , Cu^{++}
- pour l'acétylcholinestérase :
 - . iodure d'écothiopate
 - . paraoxon
 - . méthyl et éthyl parathion oxydés (Chapitre VIII paragraphe I.1.3b).

Les inhibiteurs n'étant plus réversibles immédiatement, il est nécessaire de régénérer artificiellement les membranes en utilisant les substances trouvées au cours du paragraphe III-1-d-e de cette étude.

En portant en ordonnée la réponse du capteur, en fonction de la concentration en substrat dans la phase aqueuse S_0 , le réseau des courbes obtenues figure 32 montre que les parties linéaires des courbes de réponse sont sensiblement parallèles. D'autre part, on remarque que le plateau est d'autant plus bas que la concentration en inhibiteur est importante pour un temps d'incubation donné, ou que le temps d'incubation est long pour une concentration en inhibiteur donnée (figure 33 - figure 34). En conclusion le plateau est d'autant plus bas que l'activité de la membrane est abaissée artificiellement.

4) CONCLUSION

Les résultats expérimentaux présentent un accord étroit avec

FIG. 33

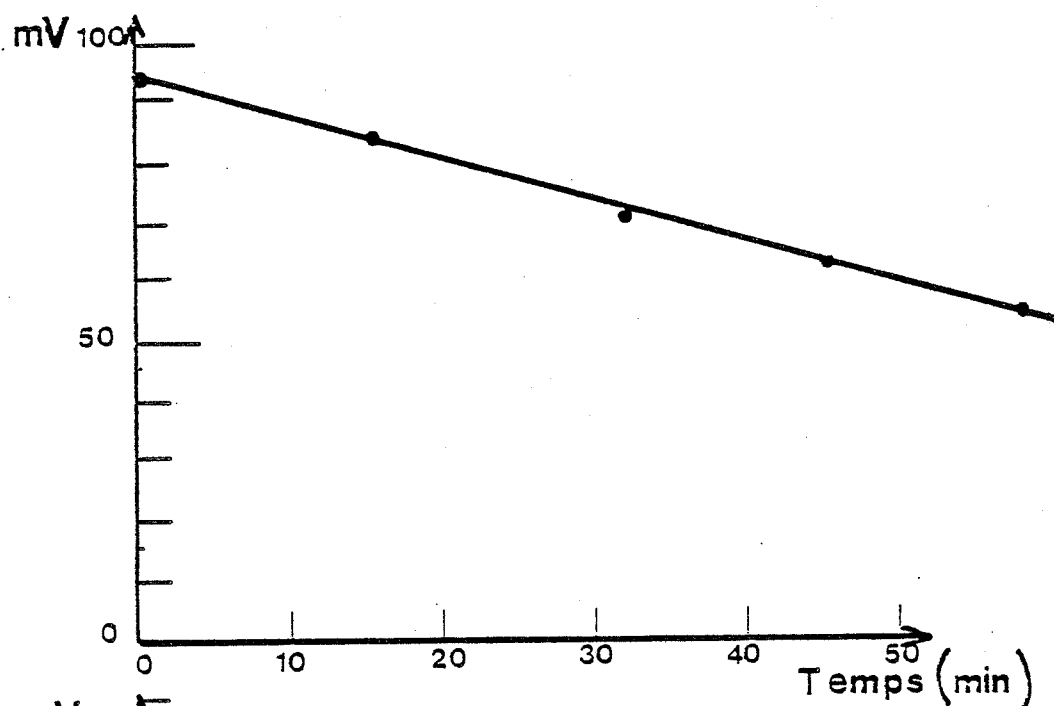


FIG. 34

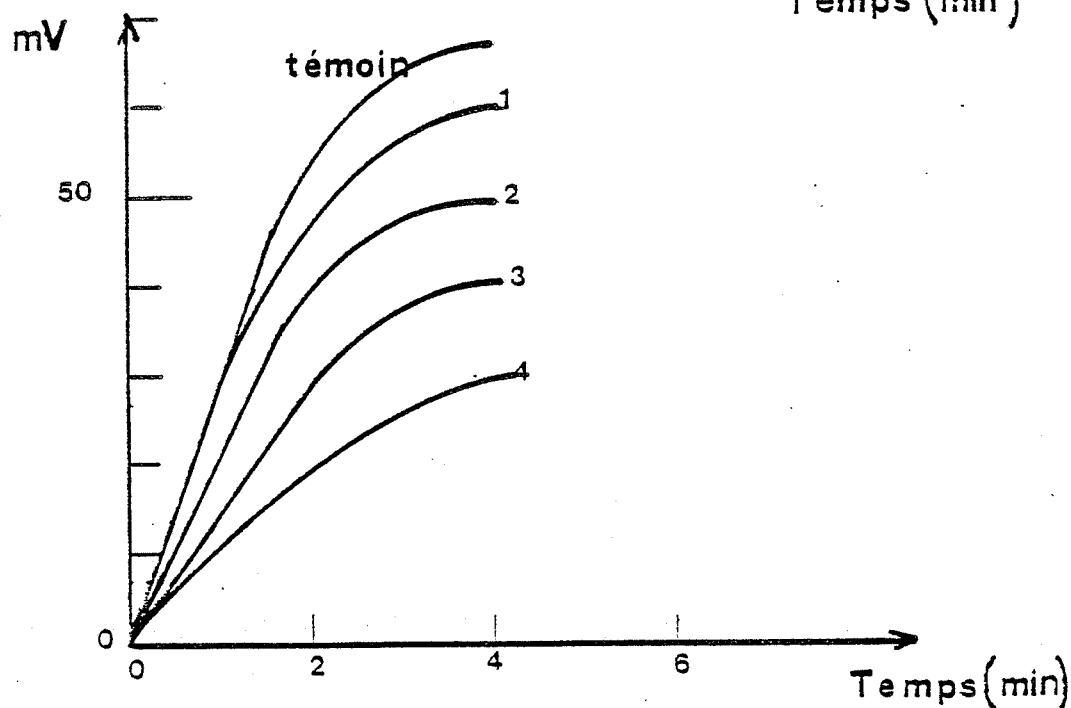


FIGURE 33 - Influence du temps d'incubation sur la réponse d'une électrode à uréase inhibée par des solutions HgCl_2 10^{-7}M $[\text{urée}] = 10^{-2}\text{M}$.

FIGURE 34 - Réponse de l'électrode à uréase pour $[\text{urée}] = 10^{-2}\text{M}$ en fonction de différentes concentrations en HgCl_2

(1) = $1,14 \cdot 10^{-7}\text{M}$

(2) = $2,7 \cdot 10^{-7}\text{M}$

(3) = $3,5 \cdot 10^{-7}\text{M}$

(4) = $5,7 \cdot 10^{-7}\text{M}$

Temps incubation = 10 minutes.

les résultats théoriques obtenus au début de cette étude.

La mise en évidence du type d'action d'un inhibiteur en phase hétérogène est relativement facile dans la mesure où la détermination de la concentration de produit formé à l'interface interne membrane enzymatique/électrode est possible.

Moyennant une étude préalable concernant la mise au point d'un capteur fiable et reproductible et une étude approfondie de la réversibilité de l'action de l'inhibiteur, couplées éventuellement à la recherche d'une substance régénératrice efficace, la comparaison de la courbe de réponse du capteur en présence de l'inhibiteur, avec la courbe de référence, permet de déduire le type principal du mode d'action de l'inhibition.

L'étude que nous avons réalisée va permettre des applications pratiques importantes, abordées au cours du chapitre suivant :

- détermination de la concentration en inhibiteurs en phase aqueuse, avec une électrode enzymatique
- détermination de la concentration de substrat en présence d'inhibiteurs. Ces cas arrivent fréquemment (dosage des métabolites en milieu biologique, dosage des composés dans l'eau en présence de polluants...)
- suivi de l'activité d'une membrane très fortement active, au cours du temps.

CHAPITRE VIII

APPLICATIONS

CHAPITRE VIII

APPLICATIONS

Les études précédentes nous permettent d'entrevoir deux possibilités :

- 1) soit le dosage des inhibiteurs dont la présence affecte la réponse de l'électrode
- 2) soit le dosage des substrats en présence des inhibiteurs puisque nous avons démontré qu'il était possible de contrôler l'effet des inhibiteurs.

I) DOSAGE DES INHIBITEURS

L'usage en médecine de certaines drogues, l'utilisation en agriculture de produits toxiques, comme des pesticides, l'augmentation de la pollution par les métaux lourds, nécessitent à l'heure actuelle une méthode de détection simple et rapide, aussi bien pour l'homme, que dans notre environnement.

Pour doser ces composés, deux possibilités :

- utiliser les techniques analytiques existantes [R.F. GOULD - 1971]
[D.F. HEATH - 1961]
- reproduire au niveau des électrodes à enzymes immobilisées, le principe de l'inhibition des systèmes enzymatiques.

L'inhibition des enzymes, uréase ou acétylcholinestérase, en solution aqueuse par les insecticides [R.D. O'BRIEN - 1960] ou les ions métalliques a fait l'objet de plusieurs études à des fins analytiques. Divers auteurs ont cherché à doser ces composés polluants par mesure de l'activité de l'enzyme libre au moyen de méthodes telles que :

- méthodes titrimétriques [J.C. GAGE - 1961]
- méthodes colorimétriques utilisant des substrats particuliers
[K.G. AUGUSTINSSON] [T.E. ARCHER - 1959] [J.E. BEAM - 1964]
- méthodes fluorimétriques [G.G. GUILBAULT - 1965]
- mesure de la concentration en substrat non décomposé [G. BAUM - 1971]
- microcalorimétrie [J.N. BALDRIDGE - 1975].

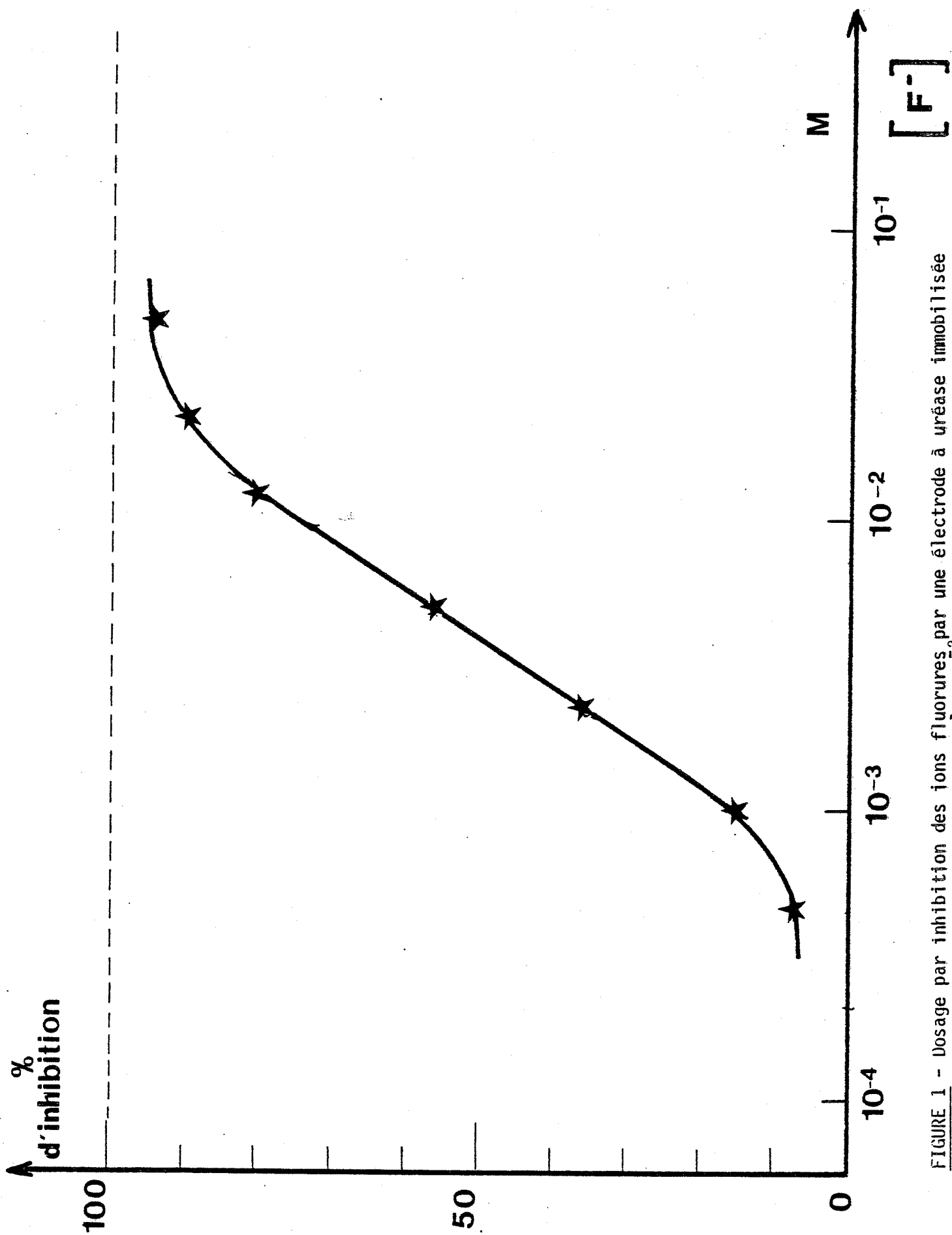


FIGURE 1 - Dosage par inhibition des ions fluorures par une électrode à uréase immobilisée
Conditions expérimentales : [urée] = 10^{-2} M, tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,25M.

Ces techniques s'effectuant toutes en phase aqueuse, l'enzyme ne peut être récupérée après utilisation.

Compte tenu du prix relativement élevé de certaines enzymes, des difficultés d'approvisionnement, et du fait que certaines méthodes exigent un équipement sophistiqué, il nous a semblé que les résultats que nous avons obtenus précédemment devaient permettre la mise en place de méthodes peu coûteuses, fiables et simples à utiliser.

1) CONDITIONS DE FABRICATION DES MEMBRANES ENZYMATIQUES

Afin de nous mettre dans des conditions favorables de détection des inhibiteurs, nous choisissons, compte tenu de nos études théoriques précédentes, de fabriquer une membrane enzymatique suffisamment active afin que la précision des mesures soit bonne, mais non chargée en excès, de telle façon que la partie linéaire de la courbe de réponse de l'électrode ne soit pas la droite limite, ce qui serait préjudiciable à la sensibilité du dosage. Ainsi toute modification, même minime, de l'activité de la membrane pourra être détectée.

2) DOSAGE DES INHIBITEURS REVERSIBLES IMMEDIATEMENT

La méthode que nous proposons ici, dérive de notre étude théorique (chapitre VII précédent) :

- l'électrode enzymatique plonge dans une solution tamponnée de concentration en substrat S_0 , exempte de tout inhibiteur. L'état stationnaire est obtenu au bout de 2 à 3 minutes environ.
- l'électrode est alors plongée successivement dans des solutions tamponnées de concentration en substrat identique S_0 , mais contenant des concentrations croissantes d'inhibiteur.
- on trace alors la courbe donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur dans la phase aqueuse.

Les figures 1 et 2 mettent en évidence le dosage des ions fluorures et de la thiourée, inhibiteurs respectivement anti-compétitifs et compétitifs de l'uréase.

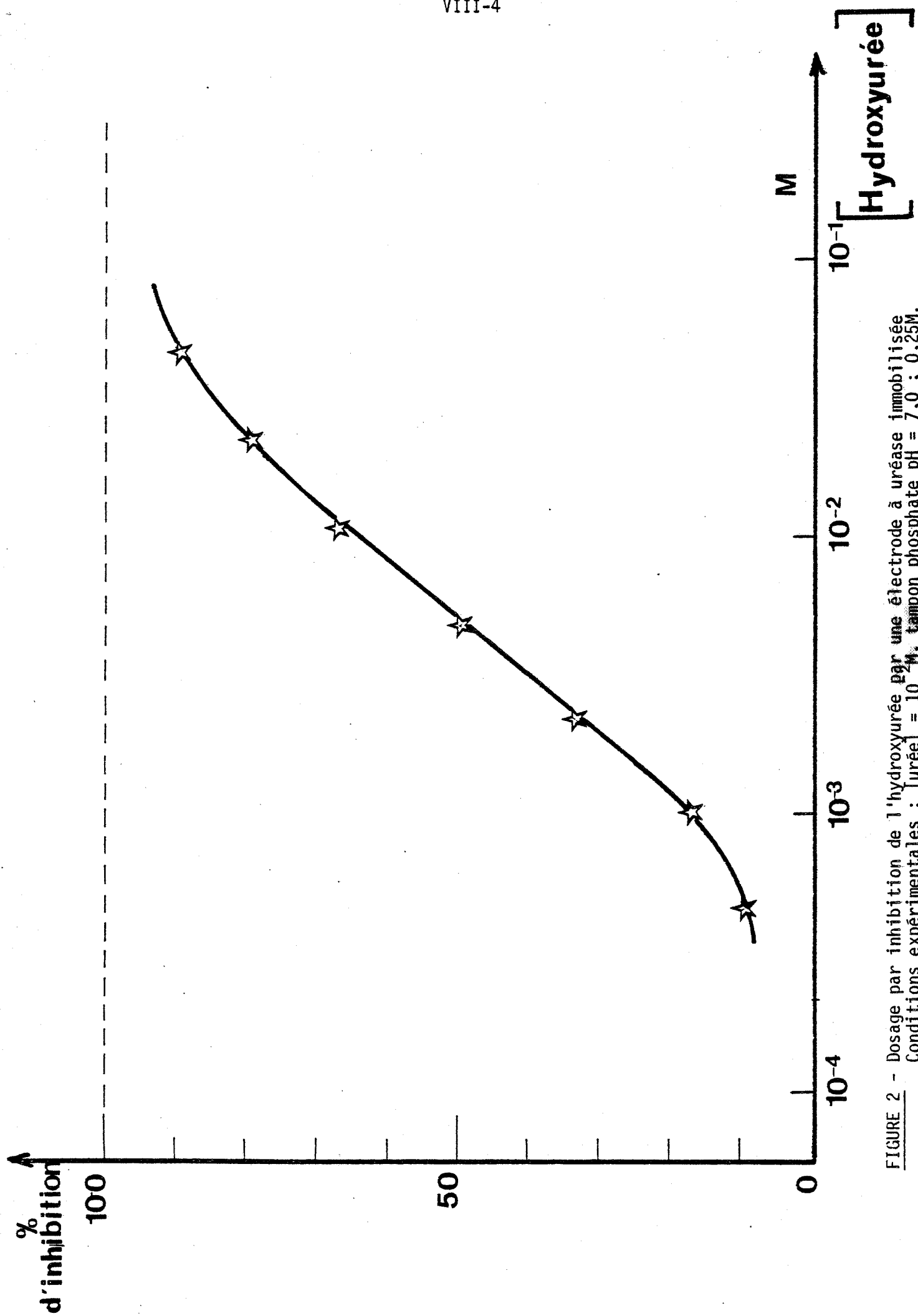


FIGURE 2 - Dosage par inhibition de l'hydroxyurée par une électrode à uréase immobilisée
Conditions expérimentales : [urée] = 10^{-4} M, tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,25M.

La figure 3 montre la possibilité de dosage de la nicotine, inhibiteur compétitif de l'acétylcholinestérase.

Nous voyons que les courbes représentant le pourcentage d'inhibition ont, quel que soit le type de l'inhibition, une partie linéaire. Il en sera de même pour les courbes de dosage des inhibiteurs. Le seuil de détection des inhibiteurs étudiés au moyen de nos électrodes est donné par le tableau suivant :

ENZYME	INHIBITEURS	SEUIL DE DETECTION EN MOLE/L	CONDITIONS DE MESURE
Uréase	F^-	10^{-4}	- [urée] : $10^{-2}M$
	Thiourée	10^{-3}	- Tampon phosphate : 0,25 M ; pH 7,0
	Hydroxyurée	10^{-3}	- $\theta = 25^\circ C$
AChE	Nicotine	10^{-3}	- [acétylcholine] : $10^{-2}M$
	Arginine	10^{-3}	- Tampon phosphate : 0,01 M ; pH 7,0
	F^-	10^{-4}	- $\theta = 25^\circ C$
	Néostigmine	10^{-6}	
	Physostigmine	10^{-8}	

Tableau : Dosage des inhibiteurs réversibles immédiatement

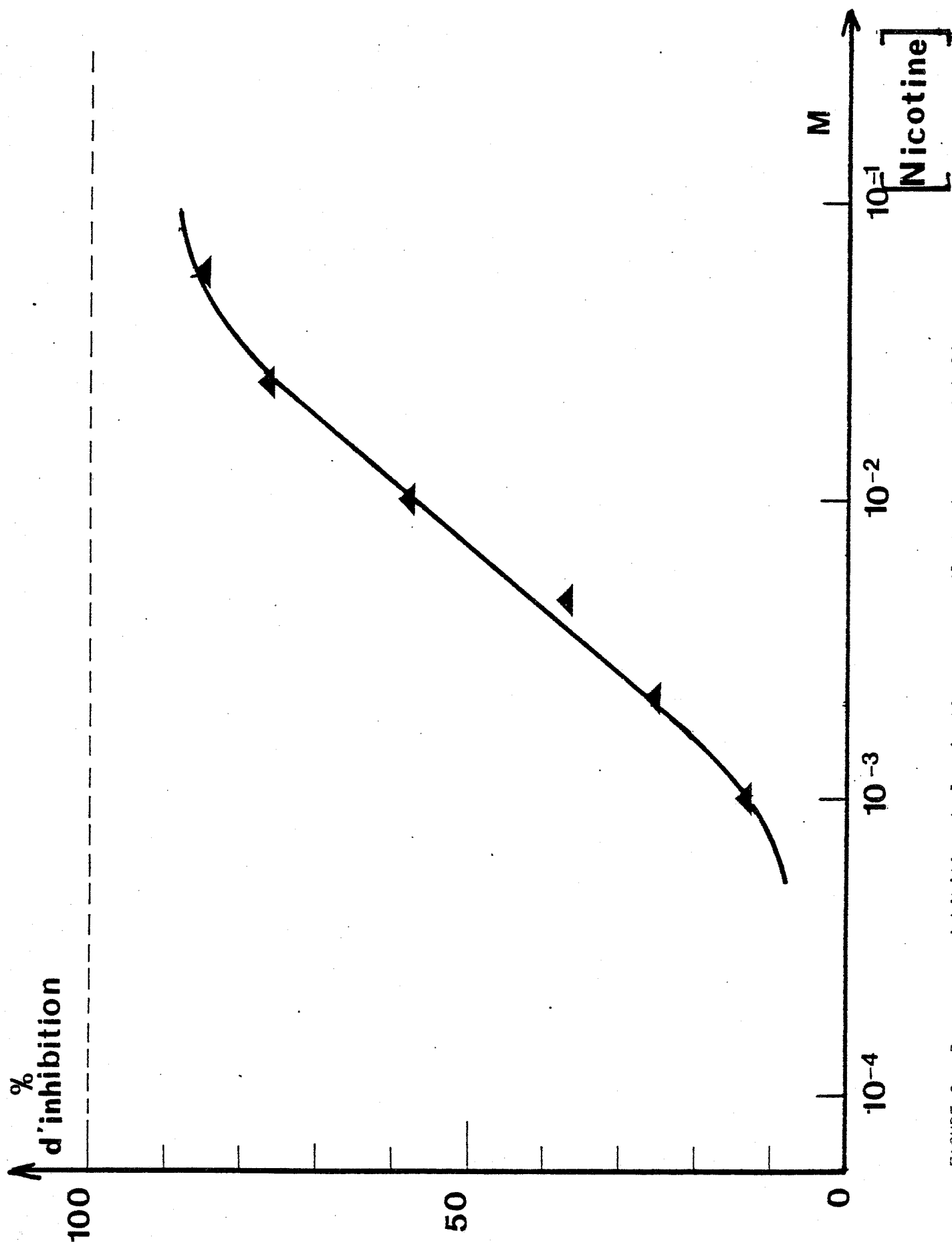


FIGURE 3 - Dosage par inhibition de la nicotine par une électrode à acétylcholinestérase.
Conditions expérimentales $[ACh] = 10^{-2}M$; tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,01M.

3) DOSAGE DES INHIBITEURS NON REVERSIBLES IMMEDIATEMENT

a) Inhibiteurs de l'uréase : ions Ag^+ , Cu^{++} , Hg^{++}

Un certain nombre de maladies et de troubles métaboliques sont dus à un manque ou à un excès d'ions métalliques dans l'organisme. Certains comme le sodium, le potassium, le calcium sont essentiels et participent aux échanges ioniques. D'autres, tels les ions lourds sont extrêmement toxiques au delà d'une certaine teneur.

La plupart des travaux effectués à ce jour sont en phase aqueuse [W.H.R. SHAW - 1954], [W.H.R. SHAW - 1961], [E.C. TOREN - 1968], [R.B. HUGUES - 1969] et ont tous en commun la grande difficulté de récupérer l'enzyme après l'action de l'inhibiteur, et de suivre ensuite l'évolution de l'intoxication.

Récemment OGREEN et MATTIASSON [L. OGREEN - 1978] [B. MATTIASON - 1978], ont proposé une méthode de dosage du mercure au moyen d'un réacteur où l'enzyme est immobilisée sur des billes ou sur une colonne poreuse. Ces mesures se font à l'aide de thermistances. Cet appareillage est complexe et coûteux.

Nos études ont montré que les ions Ag^+ , Cu^{++} , Hg^{++} sont des inhibiteurs non réversibles immédiatement. Notre méthode de dosage utilisant une membrane enzymatique sans albumine est la suivante :

- l'électrode enzymatique plonge dans une solution tamponnée, exempte de substrat, contenant l'inhibiteur, pendant un temps d'incubation T , suffisamment long de façon que le dosage soit plus précis et plus sensible.
- l'électrode est alors retirée et rincée
- l'électrode est testée, dans une solution phosphate $pH = 7,0$ de concentration $0,25M$, pour une concentration en urée déterminée ($[urée] = 10^{-2}M$ pour la plupart de nos expériences)
- la régénération de la membrane enzymatique se fait en plongeant l'électrode dans une solution de :

KI $-10^{-1}M$ pour l'inhibition par les ions Ag^+

KCN $-10^{-1}M$ pour l'inhibition par les ions Hg^{++}

EDTA $-10^{-1}M$ pour l'inhibition par les ions Cu^{++}
pendant quelques minutes.

Les figures 4 et 5 mettent en évidence les courbes de dosage des ions Hg^{++} et Ag^+ , en milieu phosphate pH = 7,0 concentration 0,25M, température 25°C, pour un temps d'incubation de 10 minutes. Plus le temps d'incubation est long et plus le seuil de détection de l'inhibiteur est abaissé. A titre d'exemple, pour un temps d'incubation de 30 minutes, le seuil de détection des ions Ag^+ et Hg^{++} est respectivement $10^{-8}M$ et $10^{-10}M$.

Nous pensons que la méthode proposée pourrait être étendue à la détection des ions Cd^{++} , Zn^{++} , Ni^{++} , Pb^{++} , inhibiteurs de l'uréase [W.H.R. SHAW - 1969], à condition de trouver une substance régénératrice efficace et sélective.

*b) Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase : iodure
d'écothiopate et pesticides*

- L'iodure d'écothiopate est un médicament utilisé pour le traitement des glaucomes chroniques ou secondaires. Il agit par blocage du système nerveux de l'oeil, en inhibant l'acétylcholinestérase.

- Les pesticides, insecticides et gaz de combat sont souvent des composés organo-phosphorés, esters de l'acide phosphorique ou de ses dérivés [B.J. JANDORF - 1955], [J.E. CASIDA - 1956], [A.L. GREEN - 1958], [P.A. GIANG - 1964], [H.O. MICHEL - 1973], [A.C. BOYER - 1977].

Grâce à leur solubilité dans les graisses, ils pénètrent facilement dans l'organisme et inhibent de manière difficilement réversible les cholinestérases.

Le développement de la lutte contre les insectes, vitale pour l'homme, a nécessité l'emploi de produits dont l'efficacité est impor-

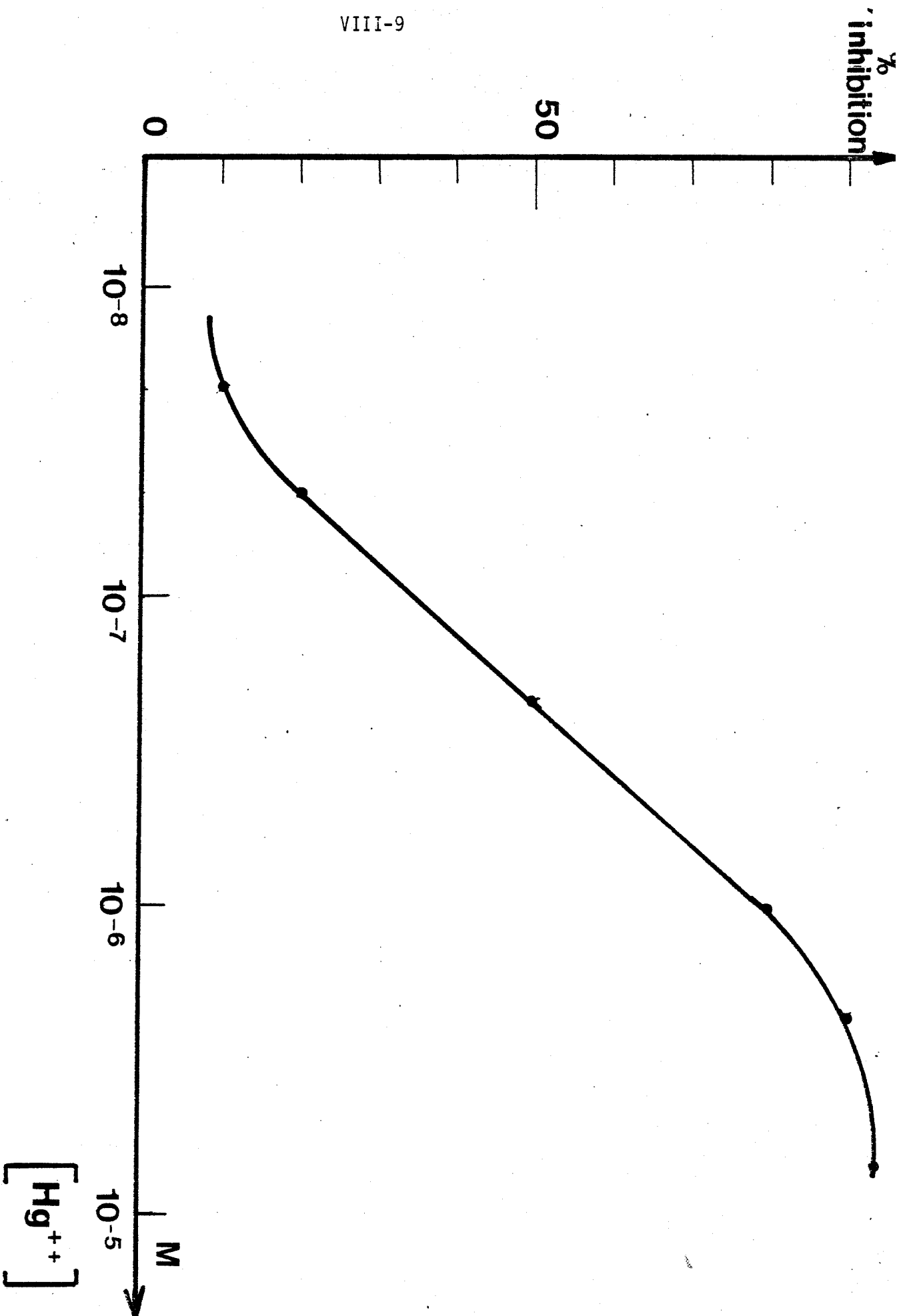


FIGURE 4 - Dosage par inhibition des ions Hg^{++}

Conditions expérimentales : tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,25 M, temps d'incubation : 10 minutes.

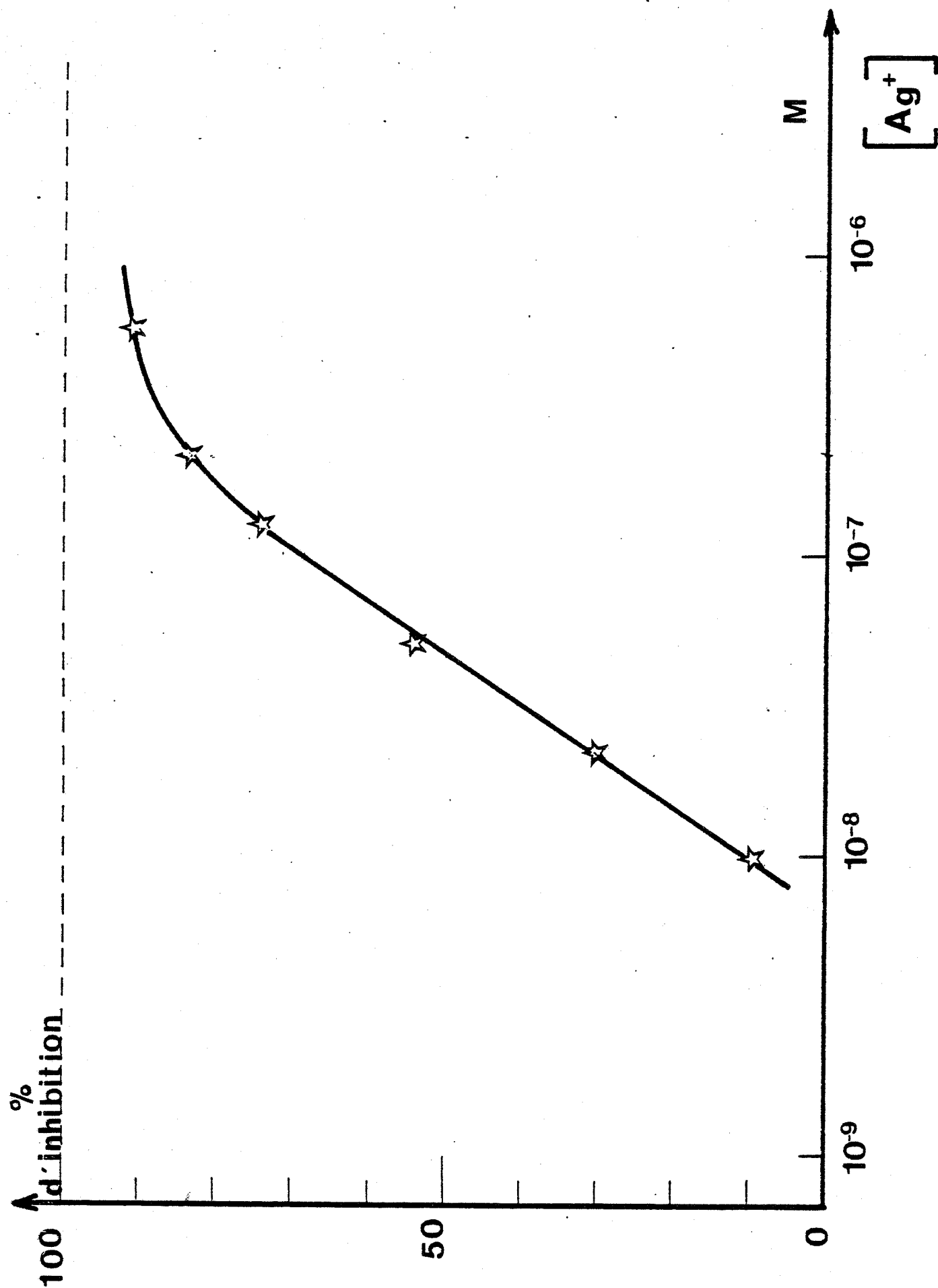


FIGURE 5 - Dosage par inhibition des ions Ag^+ . Conditions expérimentales : tampon phosphate pH = 7,0.; 0,25 M temps d'incubation de 10 minutes.

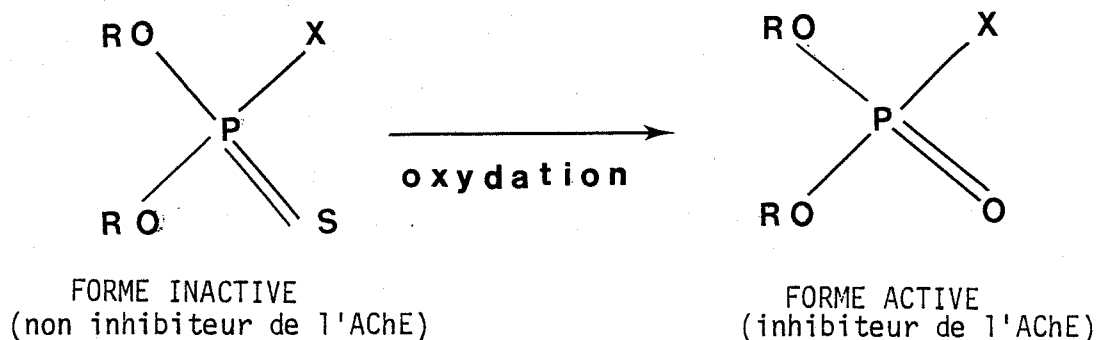
tante, mais présentant un danger accru pour l'homme. Les intoxications les plus graves et les plus fréquentes sont le fait des organophosphorés utilisés comme pesticides.

Aussi, a-t-on essayé de détecter et de doser ces éléments [J.G. GAGE - 1961]. Malheureusement, ce sont des substances toxiques à l'état de traces et les méthodes disponibles ne sont pas toujours performantes et font appel à des techniques très élaborées, telles que chromatographie en phase aqueuse [D.M. COULSON - 1960], [J.E. LOUELOCK - 1960] ou capture d'électrons [S.J. CLARK - 1961]. Face à ces difficultés, des méthodes de dosage en solution ont été proposées, par mesure de l'activité de la cholinestérase [J.E. BEAM - 1964], [R.L. SCHUTZMANN - 1969], [G.G. GUILBAULT - 1970], [M.H. SADAR - 1970], [C.E. MENDOZA - 1974], [J. BAGGAR - 1977], [W.N. DAHL - 1977], [A.W. SEITZ - 1977].

Par exemple, l'une des méthodes retenues par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) pour évaluer la présence d'insecticides dans les végétaux, utilise une chromatographie sur couche mince au moyen de la cholinestérase extraite de têtes de mouches broyées.

Nous pensons que la méthode que nous proposons est sensible, fiable et simple à mettre en oeuvre ; d'autre part, l'utilisation de substances régénératrices telles que la PAM permet la ré-utilisation de la membrane enzymatique.

Parmi les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, l'iodure d'écothiopate et le paraoxon sont des composés solubles dans l'eau. Par contre, la plupart des autres insecticides, dont l'éthyl et le méthyl parathion, le malathion... , sont des thio et dithiophosphates, composés insolubles dans l'eau, mais solubles dans les graisses, ce qui leur permet de pénétrer dans l'organisme par voie cutanée. Ces polluants sont oxydés enzymatiquement in-vivo en une forme active qui inhibe l'acétylcholinestérase.



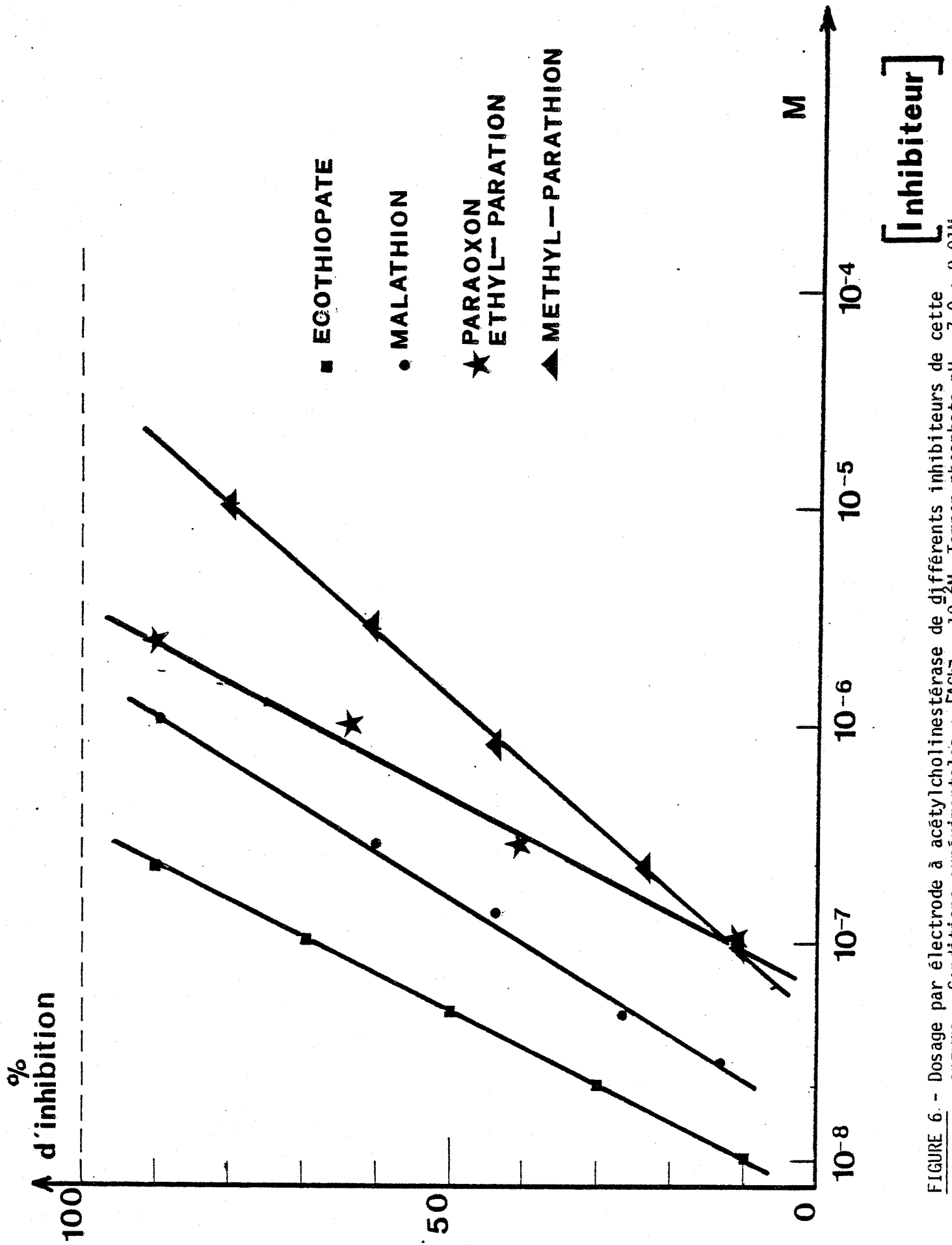


FIGURE 6. - Dosage par électrode à acétylcholinestérase de différents inhibiteurs de cette enzyme - Conditions expérimentales : $[ACh] = 10^{-2}M$. Tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,01M

Dans le cas de l'éthyl et méthyl parathion, ou du malathion, nous avons oxydé ces composés en utilisant de l'eau de brome, [R. GUYONNET - Thèse 1978] de préférence à d'autres oxydants [P.A. GIANG - 1951], [R. MISKUS - 1959], [T.E. ARCHER - 1963], [P.A. GIANG - 1966].

La méthode de dosage est donc la suivante :

- l'électrode enzymatique est mise à incuber pendant un temps T dit temps d'incubation, dans une solution exempte de substrat, mais contenant l'inhibiteur
- l'électrode est retirée, et rincée abondamment
- l'électrode est testée pour une concentration en substrat S_0
- la mesure effectuée, la membrane est régénérée en utilisant la PAM $10^{-3}M$.

La figure 6 met en évidence les courbes de dosage des différents pesticides testés dans notre laboratoire, ainsi que l'écothiopate, dans les conditions suivantes :

- temps d'incubation 10 minutes
- concentration en acétylcholine $10^{-2}M$
- tampon phosphate de concentration 0,01 M
pH = 7,0.

4) CONCLUSION

L'étude que nous venons de réaliser montre que les électrodes enzymatiques que nous avons mises au point sont aussi des capteurs performants et fiables, permettant la détermination des inhibiteurs.

Certes, dans le cas des pesticides, la sélectivité pour le dosage de ces substances est faible, du moins dans le cadre de notre travail, mais les électrodes enzymatiques font partie des techniques de détection utilisant un matériel simple. La ré-utilisation de l'enzyme après dosage, est aussi un élément important compte tenu du prix d'achat de certaines enzymes. Nous pensons que cette technique de détection et de travail présente des perspectives intéressantes pour le dosage des substances toxiques.

II) DOSAGE DU SUBSTRAT EN PRESENCE D'INHIBITEUR

Dans certains cas, la détermination de la concentration de substrat en phase aqueuse est rendue difficile par la présence d'inhibiteur. Ceci est le cas, en particulier, pour la détermination de l'urée sanguine.

De façon à stopper la dégradation du glucose sanguin après la prise de sang, des quantités importantes de fluorure de sodium sont rajoutées, (5×10^{-2} à 10^{-1} M environ). Les études que nous avons réalisées au cours des chapitres précédents montrent que les ions fluorures sont des inhibiteurs de type anti-compétitifs, réversibles de l'uréase.

Les méthodes classiques de dosage utilisant des capteurs tels que l'électrode à NH_4^+ [S.A. KATZ - 1964], [S.A. KATZ - 1965], [T. ANFALT - 1973], [G.G. GUILBAULT - 1974], à PCO_2 [G.G. GUILBAULT - 1972] ne peuvent guère être utilisées sans perte notable de précision.

Par contre, en fabricant une membrane à uréase, dans des conditions bien définies, nous pouvons doser l'urée sanguine en présence d'inhibiteur, avec la même précision qu'en l'absence d'inhibiteur, avec un appareillage simple, tout en pouvant ré-utiliser la membrane pour de nombreux dosages [J. BEAUX - 1978].

1) FABRICATION DE LA MEMBRANE

D'après les études théoriques et expérimentales décrites dans les deux chapitres précédents, nous pouvons masquer l'effet de l'inhibition au niveau de l'interface membrane enzymatique/électrode, en fabriquant une membrane enzymatique à forte activité. Pour cela nous dissolvons une quantité importante d'uréase dans de l'albumine humaine (5 à 10 unités par µlitre), nous rajoutons une quantité d'aldéhyde glutarique faible et nous laissons un temps de réticulation court (assurant tout de même un bon maintien mécanique de la membrane (3 minutes)).

Nos essais montrent qu'une telle électrode est insensible à la présence d'ions fluorures de concentration inférieure à 5×10^{-2} M

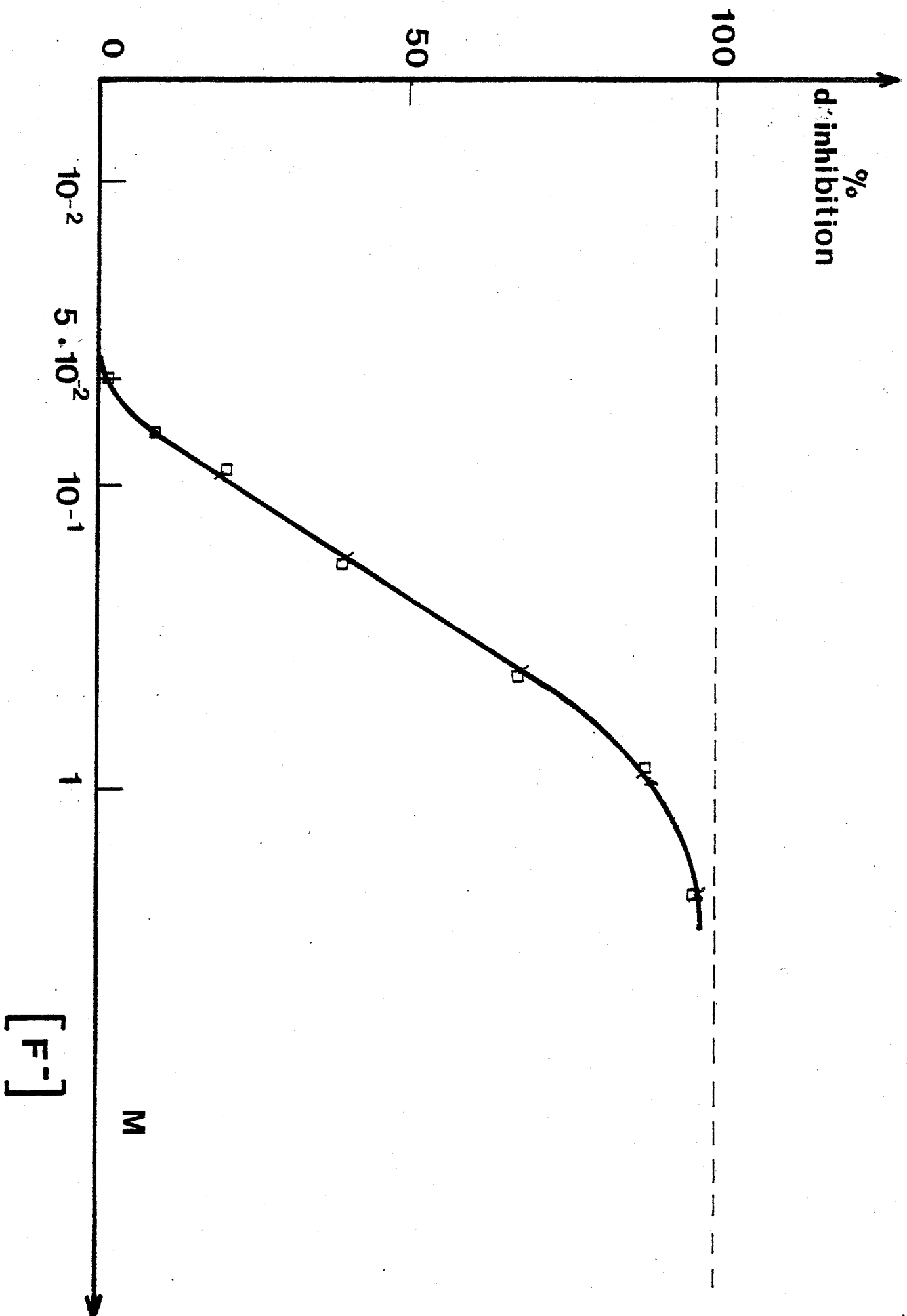


FIGURE 7 - Electrode insensible aux ions fluorures de concentration $< 5 \cdot 10^{-2} M$ destinée au dosage de l'urée sanguine.

(figure 7). En dessous de cette concentration, le pourcentage d'inhibition est nul et la réponse de l'électrode se confond avec la droite limite

$$\text{Log } (P)_{x=0} = \text{Log } S_0$$

2) MISE AU POINT DE LA METHODE

Deux électrodes ont été utilisées, l'électrode à PCO_2 RADIO-METER E 5036 ou l'électrode à NH_4^+ Philips. La fabrication de la membrane à uréase est facilitée par l'existence d'une surface plane au niveau de l'élément sensible.

a) Utilisation de l'électrode à PCO_2

Dans l'échantillon fourni par le laboratoire d'analyse médicale, la quantité de CO_2 dissous est importante. Aussi, nous en avons éliminé le maximum, en utilisant la méthode suivante :

- 2 cm^3 de sérum sont prélevés
- on rajoute 2 cm^3 d'acide chlorhydrique HCl, normal
le pH final est fortement acide
- on effectue alors le vide pendant quelques minutes avec une trompe à vide. La quasi totalité du CO_2 dissous présent dans l'échantillon est éliminée
- on prélève 0,5 cm^3 du mélange précédent, que nous rajoutons à 0,5 cm^3 d'un tampon phosphate pH = 7,30; de concentration 0,5 M; Le pH final est voisin de 7,0.

L'électrode enzymatique est plongée dans la solution finale. En utilisant la courbe de réponse de l'électrode, nous pouvons en déduire la concentration en urée dans l'échantillon initial, fourni par le laboratoire.

Par mesure de précaution, nous avons plongé une électrode à PCO_2 dépourvue de membrane enzymatique dans la solution finale, afin de vérifier que la quantité de CO_2 dissous est négligeable. En tenant compte du CO_2 dissous, l'erreur commise sur la mesure est de l'ordre de 1 à 2 %.

échantillon N°	[Urée] g/l témoin	[Urée] g/l électrode
1	0.20	0.18
2	0.23	0.21
3	0.37	0.36
4	0.45	0.44
5	0.46	0.44
6	0.60	0.57

TABLEAU 1 -

échantillon N°	[Urée] g/l témoin	[Urée] g/l électrode
1	0.18	0.13
2	0.26	0.28
3	0.42	0.41
4	0.50	0.49
5	0.83	0.84
6	1.48	1.47

TABLEAU 2 -

TABLEAU 1 : Résultats analogues obtenus lors du dosage de l'urée sanguine en l'absence d'ions fluorures par électrode enzymatique spécialement conçue par rapport au dosage témoin par méthode spectrophotométrique.

TABLEAU 2 : Mêmes résultats en présence d'ions fluorures.

Pour les échantillons médicaux témoins, la méthode utilisée consistait à effectuer une spectrophotométrie à 520 nm après addition de diacetyl monoxime thiosemicarbazide et acide sulfurique à 20 %.

Le tableau 1 met en évidence les résultats obtenus avec des échantillons témoins exempts d'ions fluorures. Les valeurs que nous avons obtenues (en moles/litre) ont été converties en grammes/litre afin de pouvoir les comparer avec les résultats témoins.

Le tableau 2 met en évidence les résultats obtenus avec des échantillons témoins contenant des ions fluorures de concentration variant de $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ à $5 \times 10^{-2} \text{ M}$.

On peut voir la concordance des résultats. Pour de fortes concentrations en urée, la désorption de gaz n'est pas nécessaire, l'interférence étant peu sensible. Lorsque la concentration en urée est faible, la détection est moins précise et demande une élimination préalable du CO_2 pour augmenter la précision et la sensibilité.

b) Electrode NH_4^+ Philips

La faible concentration d'ammoniaque au sein de l'échantillon ($2 \times 10^{-2} \text{ mg/litre}$) donne lieu à une méthode plus aisée et plus pratique, en utilisant une électrode à NH_4^+ Philips plate IS 561. Aucune désorption de gaz n'est alors nécessaire.

La méthode proposée est la suivante :

- 2 cm^3 du sérum provenant du Laboratoire d'Analyses Médicales sont dilués avec 6 cm^3 d'un tampon phosphate pH = 7,1 concentration 0,25 M
- l'électrode à NH_4^+ , dont la partie sensible est recouverte de la membrane enzymatique, est mise en contact avec la solution précédente. L'utilisation de la courbe de dosage permet d'atteindre la valeur de la concentration en urée au sein de l'échantillon initial.

Les résultats sont en accord avec ceux obtenus par le Laboratoire d'Analyses Médicales. La méthode est plus simple et plus facile à mettre en oeuvre.

3) CONCLUSION

Nous pensons que l'étude conduite précédemment peut être étendue à un nombre important de substrats. Toutefois, si nous voulons que la méthode ait un avenir médical, deux conditions s'imposent :

- l'action de l'inhibiteur doit être rapide
- l'action de l'inhibiteur doit être réversible immédiatement, ce qui était le cas pour les ions fluorures, sinon, la régénération de la membrane devra être rapide et efficace et parfois sélective.

Dans tous les cas, la membrane devra être très active afin de masquer la diminution de l'activité de la membrane enzymatique due à la présence de l'inhibiteur.

III) SUIVI DE L'ACTIVITE DES MEMBRANES A FORTE CONCENTRATION EN ENZYMES

Il est généralement admis que les enzymes immobilisées présentent une stabilité plus grande vis-à-vis des agents dénaturants (pH, température, inhibiteurs), que ces mêmes enzymes en solution.

Ce phénomène peut être attribué à plusieurs causes :

- modification de structure de l'enzyme après immobilisation
- influence du micro environnement (charges, diffusion ...).

Expérimentalement, SUDINA [G.F. SUDINA - 1982] a trouvé que la diffusion permet de contre-balancer l'effet de la perte d'activité due aux agents dénaturants. Nous allons voir que la théorie, élaborée au chapitre V, permet de donner une explication à ce phénomène.

En effet, nous avons montré, au cours des chapitres précédents

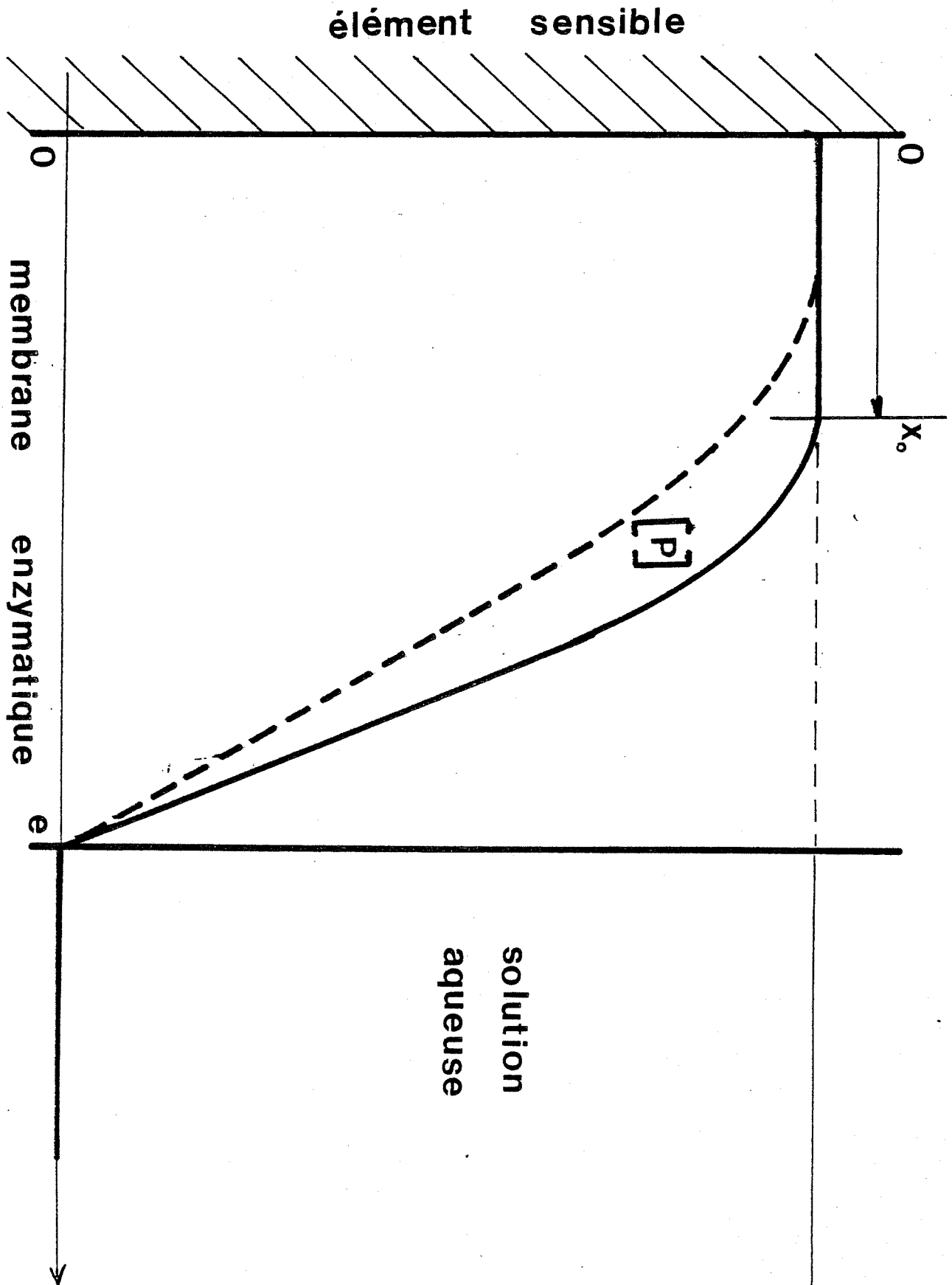


FIGURE 8 - Mise en évidence de la zone gelée $[0, x_0]$, délimitée par la frontière libre x_0 , dans le cas d'une membrane à forte activité.

_____ sans inhibiteur

----- en présence d'inhibiteur.

(chapitre VI, paragraphe II-6 - chapitre VII, paragraphe II-2-f) que les membranes à forte concentration en enzyme immobilisée présentaient une stabilité particulière face aux agents dénaturants.

Pour de telles membranes, la figure 8 (trait plein) met en évidence le profil de concentration du produit à l'intérieur de la membrane enzymatique.

On remarque : $[P] = S_0 \quad \forall x \in [0, x_0]$

En mathématique, ce phénomène est connu sous le nom de "frontière libre".

Lors de l'action d'agents dénaturants, le profil de concentration de P évolue à l'intérieur de la membrane enzymatique, (figure 8 - trait pointillé), la frontière libre rétrécit. Elle peut s'annuler pour des actions importantes de l'agent dénaturant.

Expérimentalement, l'activité mesurée est donnée par $[P](x = 0)$. Au cas où la frontière libre existe, cette mesure reste constante malgré l'action de l'agent dénaturant. On peut en déduire qu'en apparence l'activité de la membrane est restée constante.

Nous allons montrer qu'il existe un moyen permettant de suivre l'activité réelle de la membrane en utilisant des inhibiteurs réversibles. A titre d'exemple, nous proposons d'étudier l'influence de la température sur l'activité enzymatique de la membrane.

En phase homogène, les études montrent que la dénaturation de l'uréase commence à partir de 40°C environ alors qu'en apparence, l'uréase immobilisée dans une membrane très active peut résister au delà de cette température. En réalité, cette enzyme subit une dénaturation que nous allons montrer.

1) METHODOLOGIE D'ETUDE

Trois électrodes à membrane fortement active sont mises au point, ayant toutes les trois la même courbe de réponse à l'urée à 25°C, et la même courbe pourcentage d'inhibition aux ions fluorures, à la même température qui sert de référence.

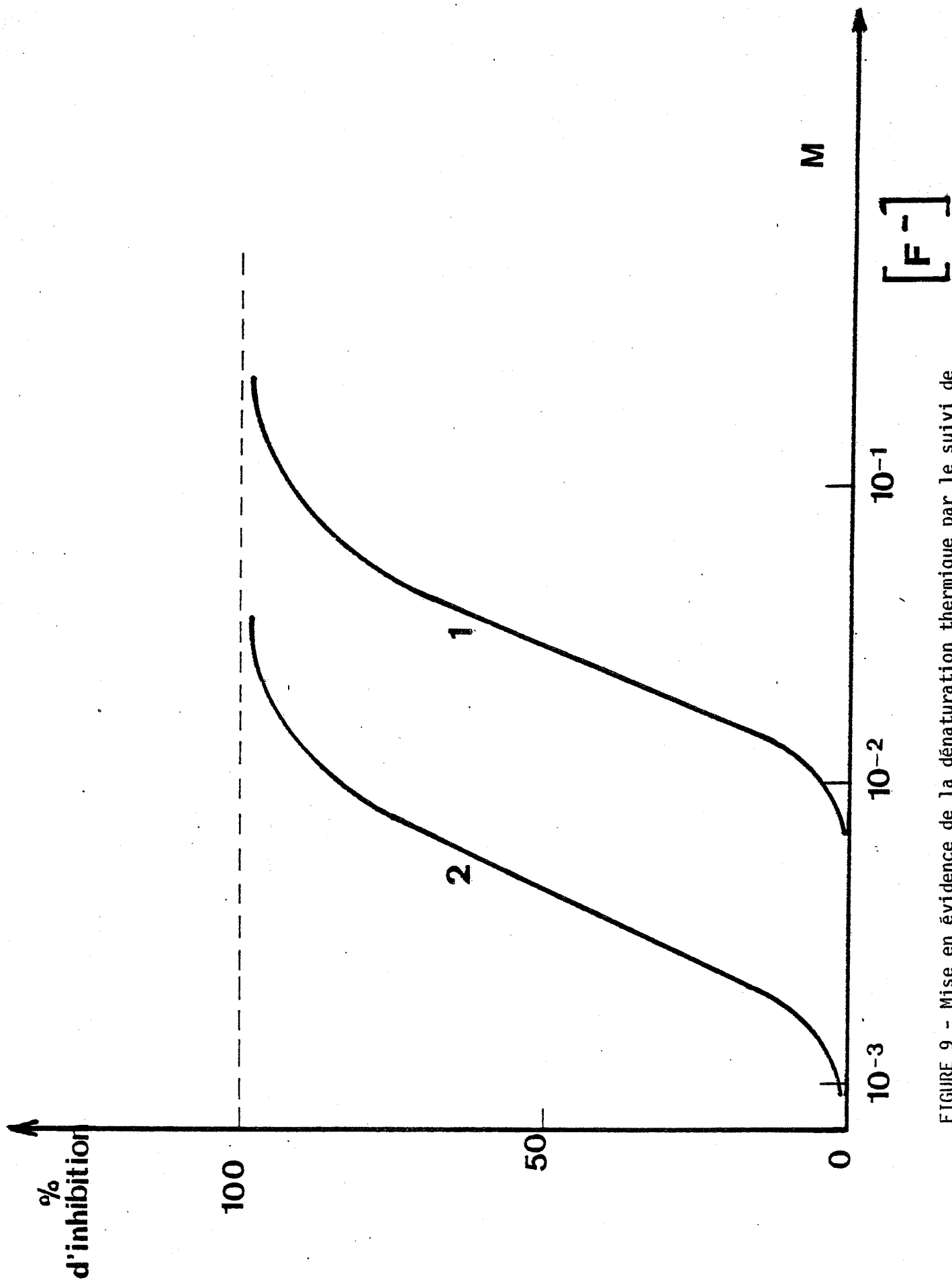


FIGURE 9 - Mise en évidence de la dénaturation thermique par le suivi de l'inhibition - (1) après 3 heures à 25° ou à 37°C : courbe non tradlatée : pas de dénaturation thermique. (2) après 3 heures à 50°C : courbe tradlatée à gauche traduisant une dénaturation thermique.

Les ions fluorures ont été retenus pour cette étude, car, comme nous l'avons vu précédemment, ce sont des inhibiteurs de l'uréase réversibles immédiatement, et, ayant une action de type anti-compétitif, les parties linéaires des courbes pourcentage d'inhibition sont translatées vers la gauche lorsque l'activité de la membrane diminue (chapitre VII - paragraphe II-2-i).

Par conséquent, il est possible de déceler toute perte d'activité due à la dénaturation, par la position relative des courbes pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur pour une concentration en substrat donnée.

Les trois électrodes sont laissées en contact pendant quelques heures, avec une solution d'urée de concentration $10^{-2}M$, l'une à $25^{\circ}C$, l'autre à $40^{\circ}C$, la dernière à $50^{\circ}C$. Les courbes de réponse de ces électrodes restent sensiblement identiques pendant toute la durée de l'expérience.

On pourrait croire que l'activité enzymatique des trois électrodes n'est pas affectée par l'élévation de température au cours de cette période.

Par contre, si on trace maintenant, ramenées à $25^{\circ}C$, les trois courbes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en ions fluorures pour une concentration en urée de $10^{-2}M$, on remarque que seule la courbe correspondant à l'électrode ayant travaillé à $50^{\circ}C$, est translatée vers la gauche par rapport à la courbe initiale (figure 9). On peut en déduire qu'à $50^{\circ}C$, l'activité de la membrane enzymatique a été affectée par la température.

2) CONCLUSIONS

a) L'activité apparente d'une membrane à forte concentration en enzyme n'est pas en relation directe avec son activité réelle.

b) L'existence d'une frontière libre dans le cas de membranes à forte concentration en enzyme, masque l'effet de la température, du pH ou la présence d'inhibiteur, contrairement à des membranes à faible

concentration d'enzyme.

c) La méthode utilisant des inhibiteurs réversibles, couplée aux courbes donnant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur, pour une concentration en substrat donnée, permet de détecter la dénaturation éventuelle d'une membrane à forte concentration en enzyme. Cette méthode permet aussi de comparer les activités réelles de membranes à forte concentration en enzyme et de suivre l'évolution de ces activités en fonction du temps. Ceci constitue une explication aux différences parfois très importantes en ce qui concerne la durée de vie des électrodes enzymatiques (rapport 1 à 4 souvent observé en pratique).

CHAPITRE IX

CAPTEURS ENTHALPIMETRIQUES

CHAPITRE IX

CAPTEURS ENTHALPIMETRIQUES

I) DOSAGE DES SUBSTRATS

Lors des études précédentes, nous nous sommes attachés à traduire les variations des concentrations de substrat ou de produit à l'interface interne membrane enzymatique/électrode.

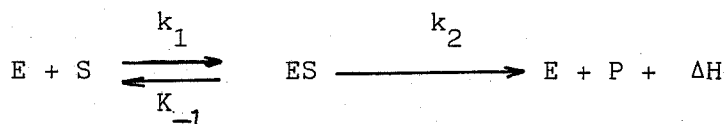
Or, à toute réaction est rattachée la variation de l'enthalpie libre du système ΔH , négative si la réaction est exothermique, positive si la réaction est endothermique.



La variation de l'enthalpie libre du système peut être considérée comme un produit de la réaction, et en conséquence, devrait pouvoir être mesurée par un capteur enthalpimétrique. [C.L. COONEY - 1974], [B. MATTIASON - 1978].

1) ETUDE MATHEMATIQUE

Modèle de base : Soit la réaction enzymatique



La variation de substrat et de produit au sein de la membrane est régie par le système d'équations (I)

$$(I) \quad \left[\begin{array}{l} \frac{\partial S}{\partial t} - D \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \\ \frac{\partial P}{\partial t} - D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \end{array} \right.$$

La réaction entraîne une variation de l'enthalpie libre du système ΔH et une variation de température par unité de temps.

$$\left(\frac{\partial \theta}{\partial t} \right)_{\text{réaction}} = \frac{\Delta H}{\rho C} \frac{V_m S}{K_m + S} \quad [V. \text{BOUGNOL} - 1976]$$

avec C = capacité thermique de la membrane
et ρ = masse volumique

Le transfert de chaleur à l'intérieur de la membrane est :

$$\left(\frac{\partial \theta}{\partial t} \right)_{\text{diffusion}} = \frac{\lambda}{\rho C} \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2}$$

où λ = conductivité spécifique thermique

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \left(\frac{\partial \theta}{\partial t} \right)_{\text{réaction}} + \left(\frac{\partial \theta}{\partial t} \right)_{\text{diffusion}}$$

$$\text{d'où} \quad \frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\lambda}{\rho C} \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} + \frac{\Delta H}{\rho C} \frac{V_m S}{K_m + S}$$

A l'état stationnaire, le système mathématique régissant le phénomène est :

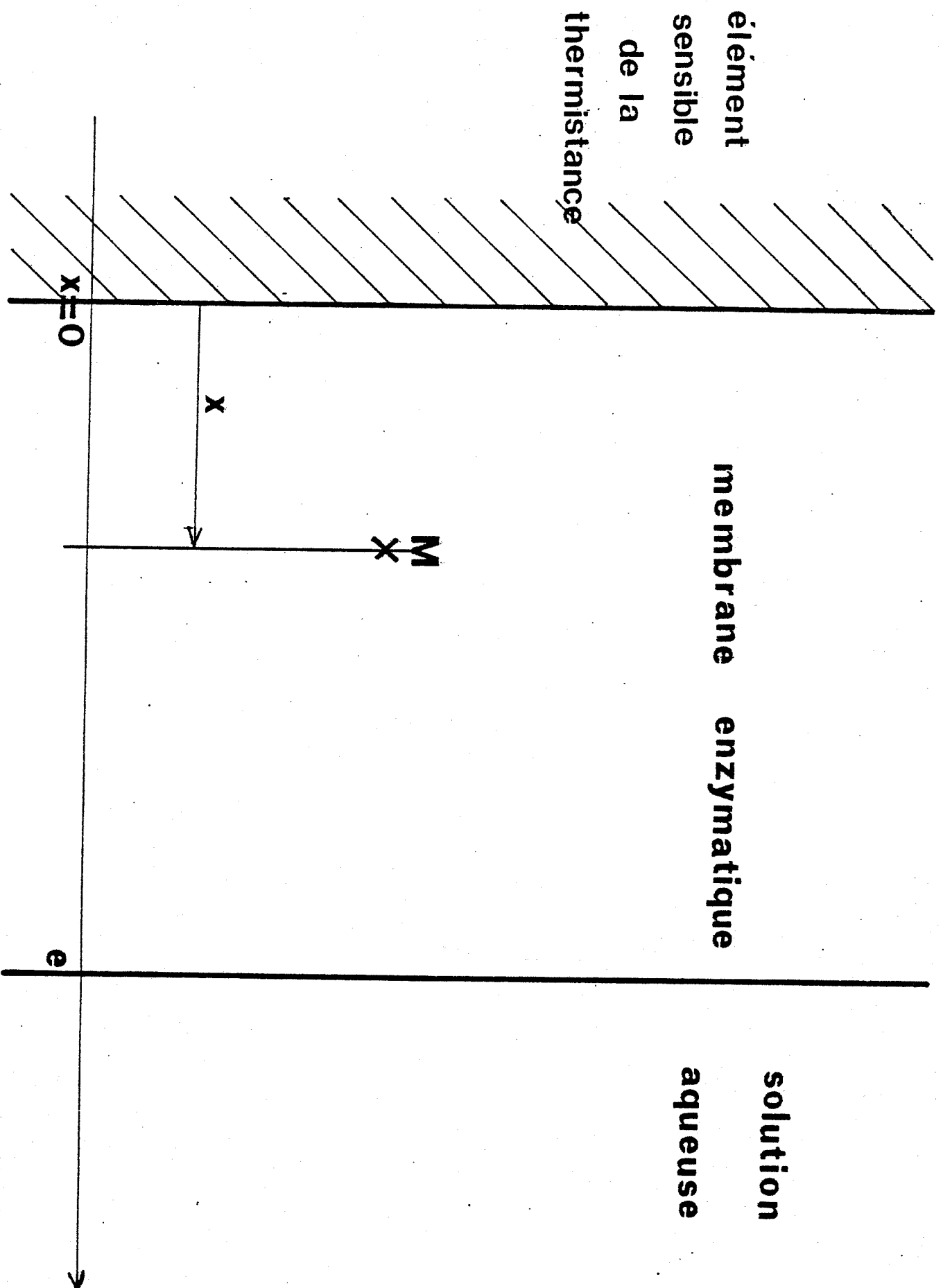


FIGURE 1 - Représentation schématique d'une thermistance enzymatique au contact d'une solution de substrat.

$$(II) \quad \left[\begin{array}{l} -D \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad (a) \\ -D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \frac{V_m S}{K_m + S} = 0 \quad (b) \\ \frac{\lambda}{\rho C} \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} + \frac{\Delta H}{\rho C} \frac{V_m S}{K_m + S} \quad (c) \end{array} \right.$$

Etude mathématique

Le système précédent doit être complété par un certain nombre de conditions (figure 1) :

$$\forall x > e \quad [S] = S_0, [P] = 0, \quad \theta = \theta_0 \quad (1)$$

$$\text{en } x = 0 \quad \left(\frac{\partial S}{\partial x} \right)_{x=0} = \left(\frac{\partial P}{\partial x} \right)_{x=0} = \left(\frac{\partial \theta}{\partial x} \right)_{x=0} = 0 \quad (2)$$

Afin de simplifier l'étude, et face à la difficulté analytique de traduire les conditions (2), l'étude mathématique peut être entreprise en considérant le système d'équations (II) couplé à la condition (1).

$$\forall x \in] -\infty, -e] \cup [e, +\infty [; [S] = S_0, [P] = 0, \quad \theta = \theta_0 \quad (1')$$

soit en considérant une membrane d'épaisseur double ($-e \leq x \leq +e$) plongeant de part et d'autre dans une solution de substrat de concentration S_0 . Les courbes donnant la variation de $[S]$, $[P]$, θ en tout point de la membrane, admettent un axe de symétrie ($x = 0$) ; en ce point les courbes admettent une tangente de pente nulle. La condition (2) est bien vérifiée.

A l'état stationnaire, la combinaison des équations (a) et (b) permet d'écrire :

$$\frac{\partial^2 S}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} = 0$$

$$\forall x \in [0, e] \quad S(x) + P(x) = S_0 \implies P(x) = S_0 - S(x)$$

La combinaison des équations (a) et (c) donne :

$$+ \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2} + \frac{D\Delta H}{\lambda} \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} = 0$$

$$\text{soit } \theta_{(x)} - \theta_0 = + \frac{D\Delta H}{\lambda} [S_0 - S_{(x)}]$$

La connaissance du profil de [S] est suffisante, à l'état stationnaire, afin de déterminer les profils de [P] et θ , en tout point de la membrane.

Résolution analytique

Nous avons utilisé les méthodes de calcul développées chapitre V, nous permettant d'atteindre, à l'état stationnaire, le profil de [S] en tout point de la membrane.

D'autre part, à l'interface interne capteur/membrane enzymatique, nous avons, lors de l'approximation par la cinétique d'ordre 1

$$\text{Log} \left[[P]_{x=0} \right] = \text{Log } S_0 + K$$

$$K = \text{constante} = \text{Log} \left[1 - \frac{1}{\text{ch}\left(\frac{V_m e}{DK_m}\right)} \right]$$

en tout point de la membrane, nous avons la relation

$$\theta_{(x)} - \theta_o = \frac{D\Delta H}{\lambda} [S(x) - S_o] = \frac{-D\Delta H}{\lambda} P(x)$$

en particulier en $x = 0$

$$\theta_{x=0} - \theta_o = \frac{-D\Delta H}{\lambda} [P]_{(x=0)}$$

si la réaction est exothermique $\Delta H < 0$ et $\theta_{x=0} > \theta_o$

si la réaction est endothermique $\Delta H > 0$ et $\theta_{x=0} < \theta_o$

nous écrivons alors :

$$\theta_o - \theta_{x=0} = \frac{D\Delta H}{\lambda} [P]_{x=0}$$

Pour une réaction exothermique, posons

$$\Delta\theta = \theta_{x=0} - \theta \geq 0 \quad \begin{array}{l} \text{élévation de température à} \\ \text{l'interface interne capteur/} \\ \text{membrane enzymatique} \end{array}$$

$$\Delta\theta = \frac{-D\Delta H}{\lambda} [P]_{x=0}$$

$$\text{Log } (\Delta\theta) = \text{Log } [P]_{x=0} + \text{Log } \left(\frac{-D\Delta H}{\lambda} \right)$$

$$\text{soit } \text{Log } (\Delta\theta) = \text{Log } S_o + K + \text{Log } \left(\frac{-D\Delta H}{\lambda} \right)$$

$$\text{Log } (\Delta\theta) = \text{Log } S_o + \text{constante}$$

La courbe donnant la variation de $\Delta\theta$, élévation de température à l'interface interne capteur/ membrane enzymatique en fonction de S_o , concentration en substrat dans la phase aqueuse, dans un diagramme bi-logarithmique admet une partie linéaire de pente égale à 1.

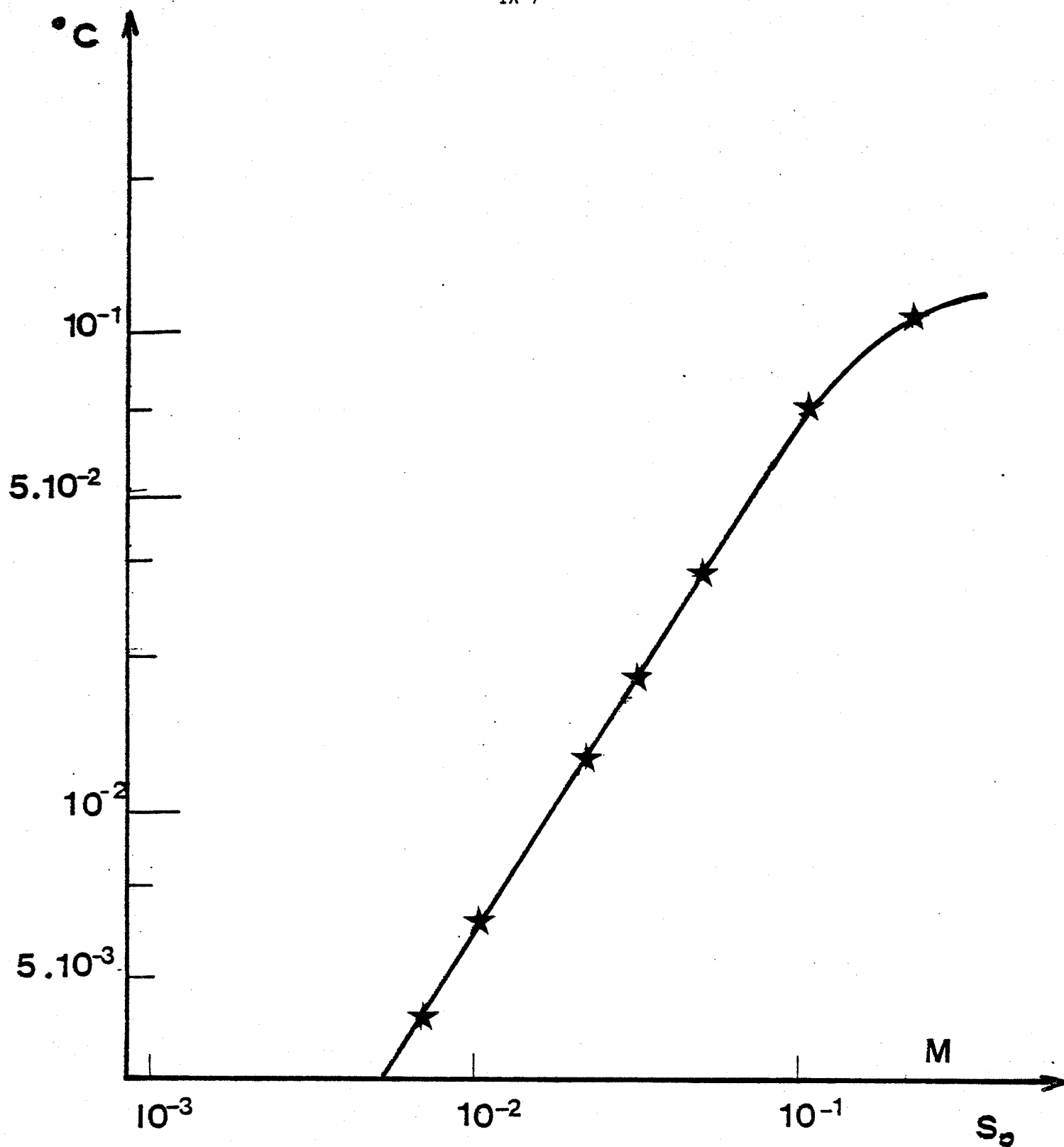


FIGURE 2 - Etude mathématique de la variation de température à l'interface thermistance/membrane enzymatique en fonction de la concentration en substrat dans le cadre d'une réaction exothermique.

La courbe s'incurve, et atteint un palier lorsque la concentration en substrat augmente indéfiniment (approximation d'ordre 0)(figure 2).

Remarque : En traçant $\Delta\theta$ en fonction de S_0 , dans un diagramme bi-logarithmique, les courbes de réponse obtenues ont toutes une partie linéaire de même pente.

Les parties linéaires des courbes de réponse sont donc toutes parallèles, et admettent une position limite que nous appellerons "droite limite" lorsque la membrane devient très active.

Cette droite limite a pour équation :

$$\text{Log } [\Delta\theta] = \text{Log } [S_0] + \text{Log } \left(\frac{-D\Delta H}{\lambda} \right)$$

Bien entendu, deux cas extrêmes seront à distinguer:

Membrane peu active : La courbe de réponse est située en dessous de la droite limite. A l'interface interne capteur/membrane enzymatique, nous avons

$$[S]_{x=0} > 0 \text{ et } [P]_{x=0} < S_0 \quad (\text{figure 3})$$

Membrane très active : La courbe de réponse est la droite limite. A l'interface interne capteur/membrane enzymatique, nous avons

$$[S]_{x=0} = 0 \text{ et } [P]_{x=0} = S_0 \quad (\text{figure 4})$$

Remarque : Toutes les conclusions des études menées au chapitre VI, relatives au pH, température, activité de la membrane, sont valables dans le cadre de l'étude ci-contre.

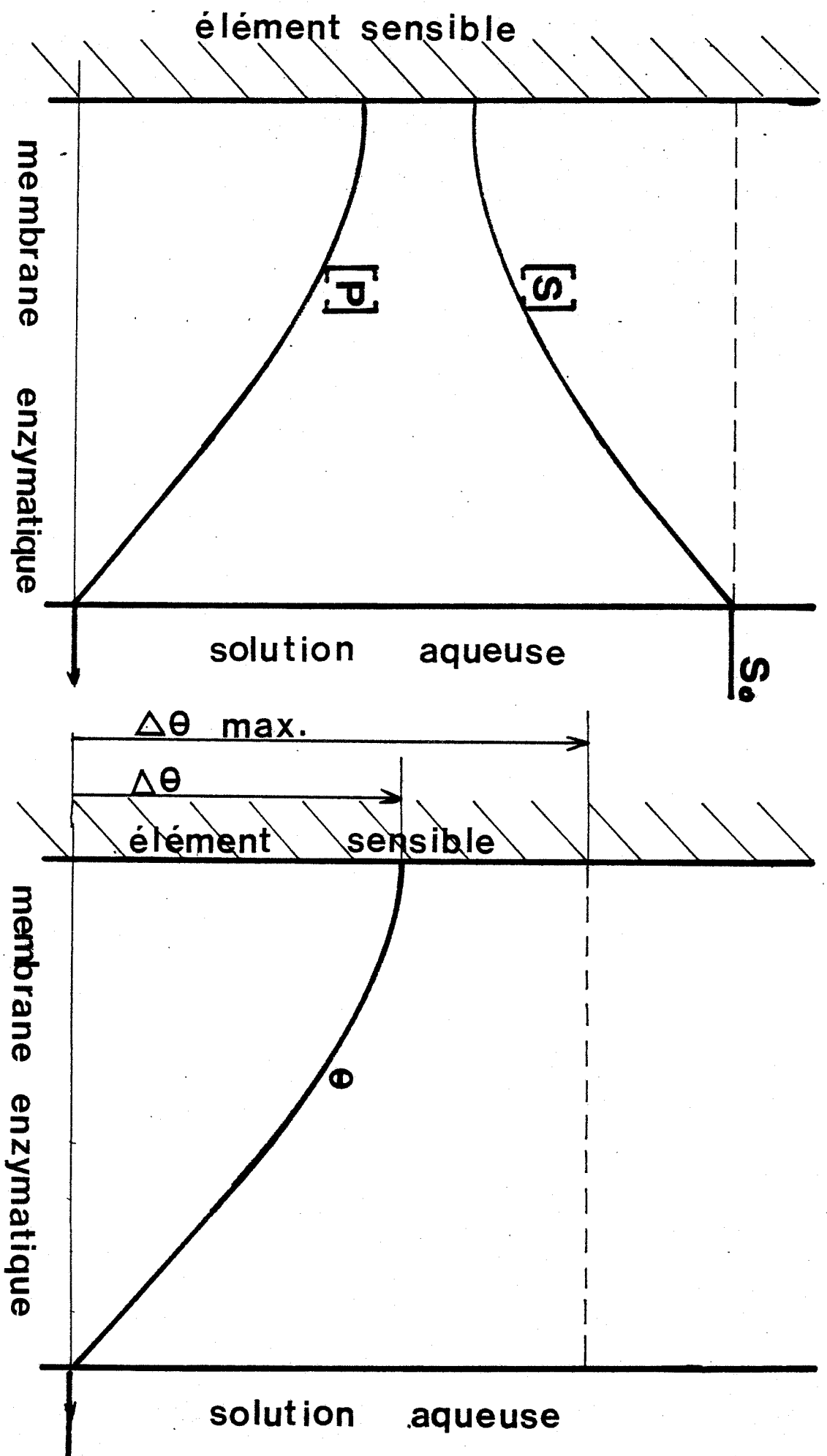


FIGURE 3 - Profils de $[S]$, $[P]$, de température θ , à l'état stationnaire dans une membrane à faible activité.

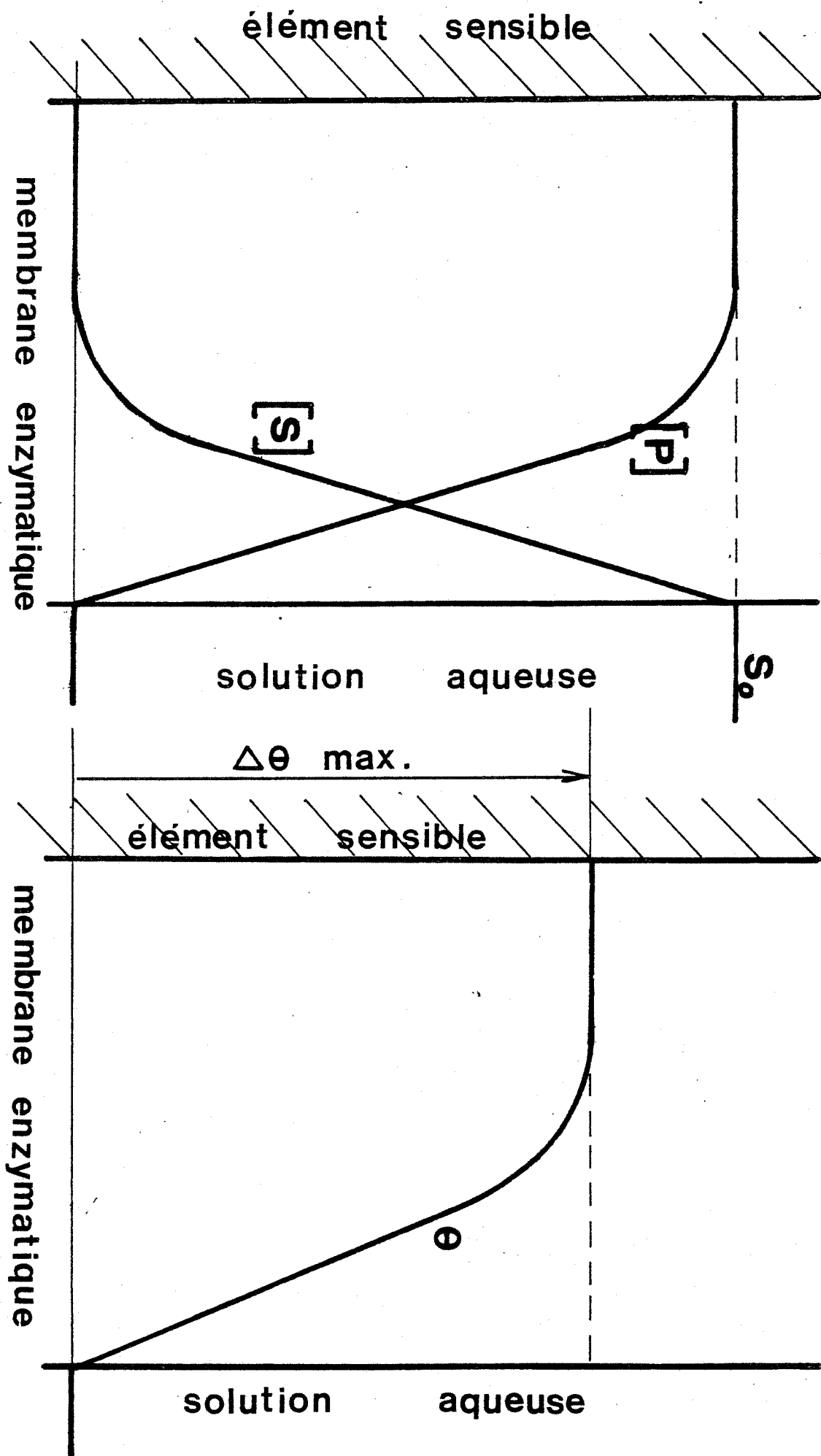


FIGURE 4 - Profils de $[S]$, $[P]$ et de température θ , à l'état stationnaire dans une membrane à activité élevée.

2) MATERIELS ET METHODES

La mise au point des capteurs enthalpimétrique, a été effectuée dans notre laboratoire [D. VALLIN - 1978].

- Enzymes utilisées

Seule l'uréase a été utilisée : la variation de l'enthalpie libre de la réaction est $\Delta H = - 12,8 \text{ kcal}$.

Pour l'acétylcholinestérase, la variation de l'enthalpie libre est trop faible, et les résultats expérimentaux obtenus ne sont pas significatifs.

- Matériel - méthode

Deux thermistances de caractéristiques sensiblement identiques (Feenwall Electronics - résistance à 25°C = 2000 Ω , variation en pourcentage de résistance à 25°C = - 3,9) sont reliées à un pont de Wheastone (temperatur Messgerat fabriqué par KNAUER).

Une des thermistances sert de référence, et est recouverte d'une membrane albumine humaine-aldéhyde glutarique, exempte d'enzyme. La deuxième est recouverte d'une membrane d'épaisseur sensiblement identique contenant l'enzyme réticulée.

La méthode de fabrication des membranes est analogue à celle décrite chapitre IV : une goutte du mélange albumine-(enzyme)-aldéhyde glutarique fabriqué, est déposée à l'extrémité de la thermistance.

Afin de limiter les pertes calorifiques par courant de convection, au niveau des thermistances, un manchon en verre fabriqué spécialement, équipe chaque thermistance (figure 5).

Toutes les mesures ont été effectuées dans une solution tampon phosphate pH = 7,0 ; 0,25 M, réglée au 1/20^e de degré par thermostat LAUDA.

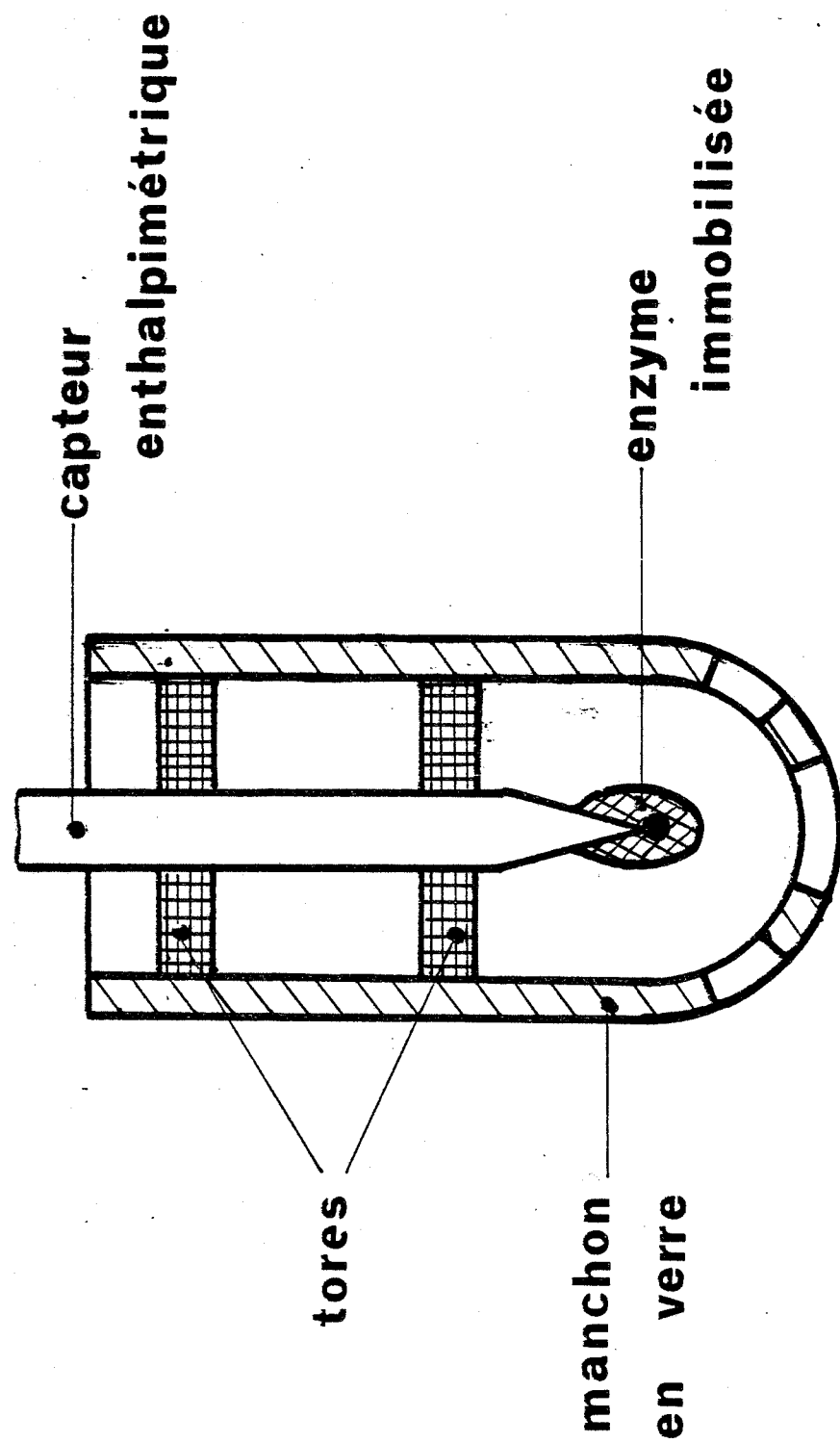


FIGURE 5 - Schéma du capteur enthalpimétrique à enzyme immobilisée.

3) RESULTATS EXPERIMENTAUX

La figure 6 met en évidence les courbes de réponse de deux capteurs enthalpimétriques utilisant deux concentrations différentes en enzymes, en fonction de la concentration en substrat dans la phase aqueuse, dans un diagramme bi-logarithmique.

On remarque :

- la détection minimale significative des capteurs enthalpimétriques à uréase immobilisée est de $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ en urée
- les courbes de réponse ont des parties linéaires parallèles
- cette partie linéaire est d'autant déplacée vers la gauche que la membrane est plus active
- la pente des parties linéaires est bien égale à l'unité, quelle que soit l'activité de la membrane, comme le prévoit l'étude mathématique du paragraphe 1 de ce même chapitre.

Remarque importante :

La comparaison des études théoriques et expérimentales doit être menée avec le plus grand soin, car dans le cas de l'uréase, les hypothèses mathématiques ne peuvent être tout à fait vérifiées expérimentalement.

D'une part, si les conditions

$$\left(\frac{\partial S}{\partial t}\right)_{x=0} = \left(\frac{\partial P}{\partial t}\right)_{x=0} = 0$$

semblent plausibles, par contre la condition $\left(\frac{\partial \theta}{\partial t}\right)_{x=0} = 0$ l'est moins.

D'autre part, compte tenu de la limite minimale de détection du substrat, la variation de pH à l'intérieur de la membrane enzymatique n'est plus négligeable (chapitre VI) ; V_m et K_m peuvent varier à l'intérieur de

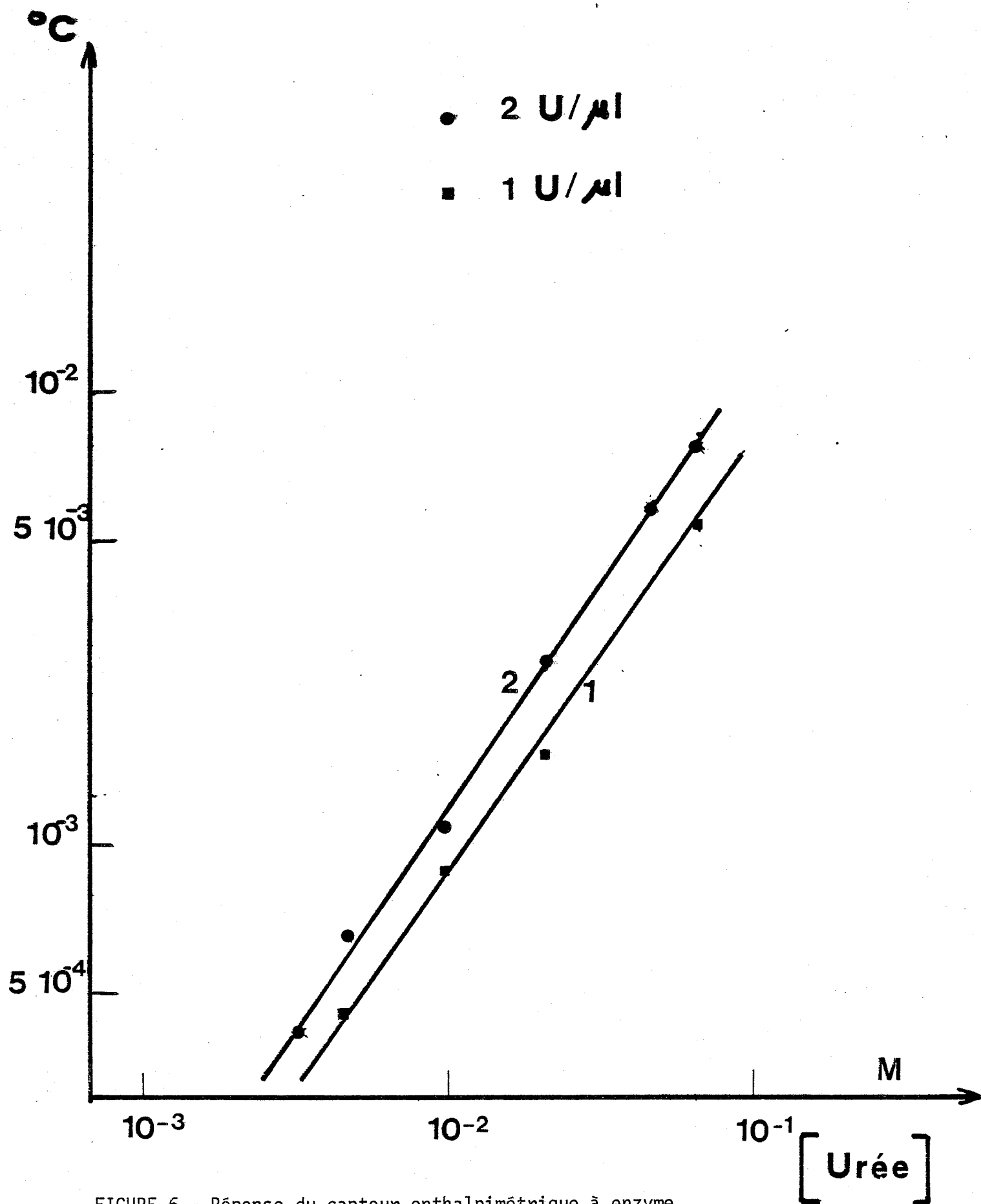


FIGURE 6 - Réponse du capteur enthalpimétrique à enzyme en fonction de la concentration en urée.

la membrane enzymatique. Une étude complète incluant les variations de pH, V_m , K_m a été réalisée, au sein de notre laboratoire [D. VALLIN - 1981].

4) CONCLUSIONS DE L'ETUDE

Les capteurs enthalpimétriques sont un moyen supplémentaire d'étude des réactions enzymatiques. Leur utilisation est moins aisée que celle des électrodes et suppose un grand soin apporté à l'isolation thermique des capteurs vis-à-vis du milieu extérieur ainsi qu'à la régulation thermique.

D'autre part, un certain nombre de réactions enzymatiques, ont des variations d'enthalpie libre trop faibles pour être détectées compte tenu du bruit de fond. Seules trois enzymes ont pu donner lieu à des applications analytiques : la catalase [V. BILHOU - 1976], l'uréase, le glucose oxydase [D. VALLIN - 1978].

Enfin, les hypothèses mathématiques pour être parfaitement justifiées, supposent des conditions de travail difficiles à réaliser en pratique. Toutefois le capteur enthalpimétrique à uréase immobilisée mis au point précédemment, présente un complément intéressant pour l'étude des phénomènes d'inhibition.

II) ETUDE DES PHENOMENES D'INHIBITION

Reprenant les résultats obtenus lors du chapitre VII, sur les phénomènes d'inhibition, nous avons testé les inhibiteurs suivants :

- inhibiteurs compétitifs : thiourée, hydroxyurée
- inhibiteurs anti-compétitifs : ions fluorures
- les ions Ag^+ et Hg^{++}

Le mode opératoire adopté est celui décrit chapitre VII paragraphe III à savoir :

- pour les inhibiteurs réversibles immédiatement, l'inhibiteur est rajouté lorsque l'état stationnaire est atteint

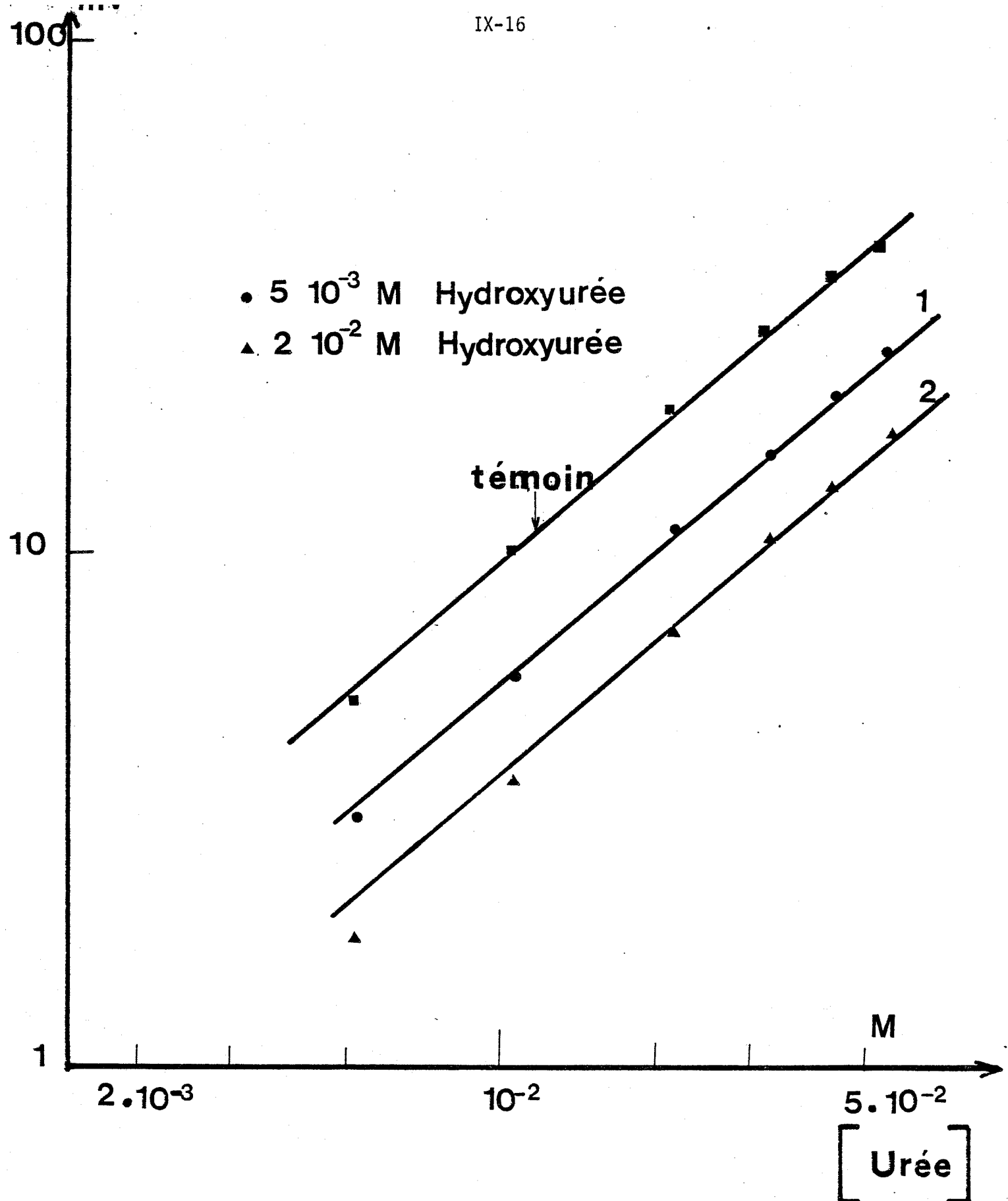


FIGURE 7 - Influence de la concentration en hydroxyurée sur la réponse du capteur enthalpimétrique à uréase immobilisée.

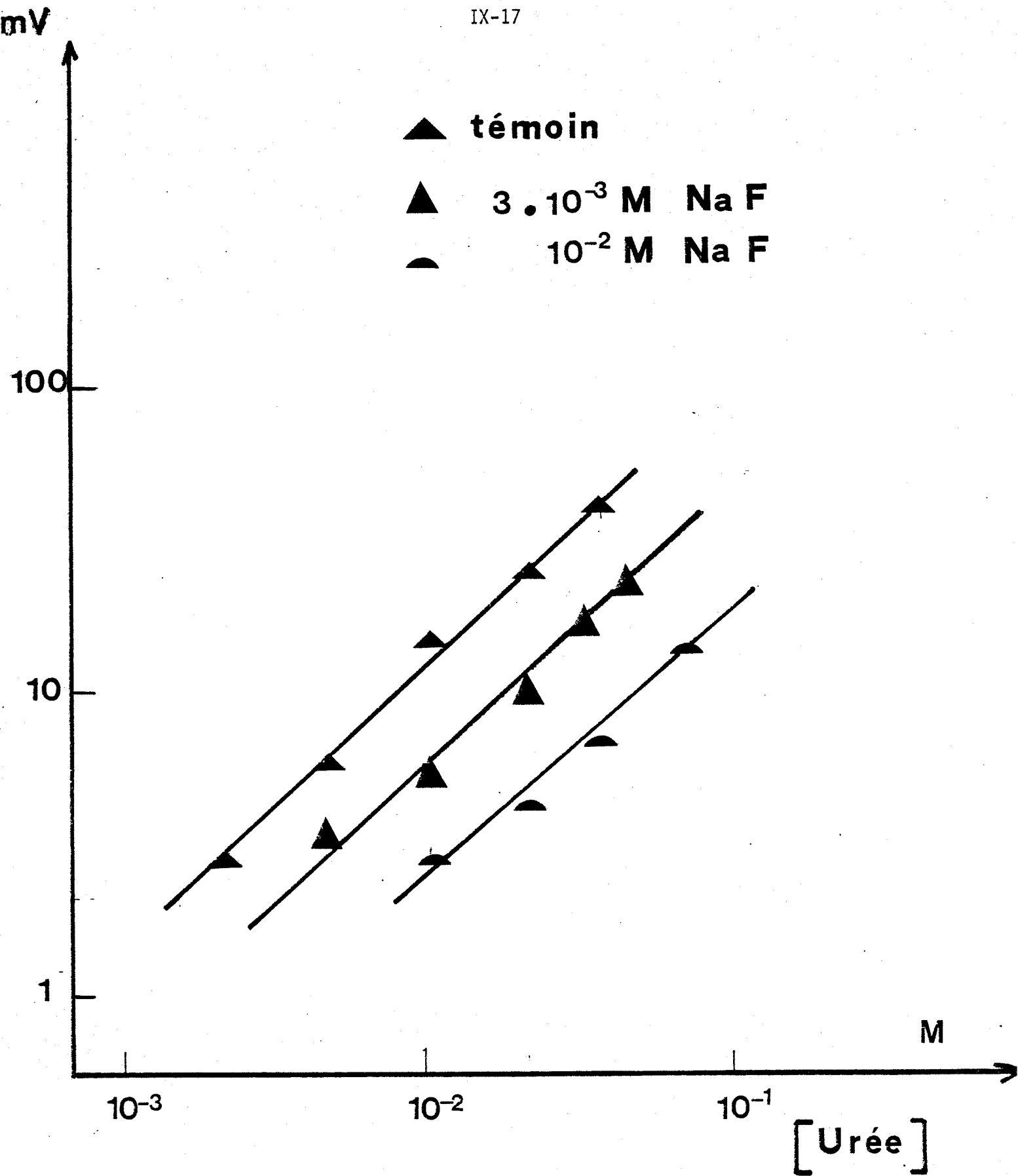


FIGURE 8 - Influence de la concentration en ions fluorures sur la réponse du capteur enthalpimétrique à uréase immobilisée.

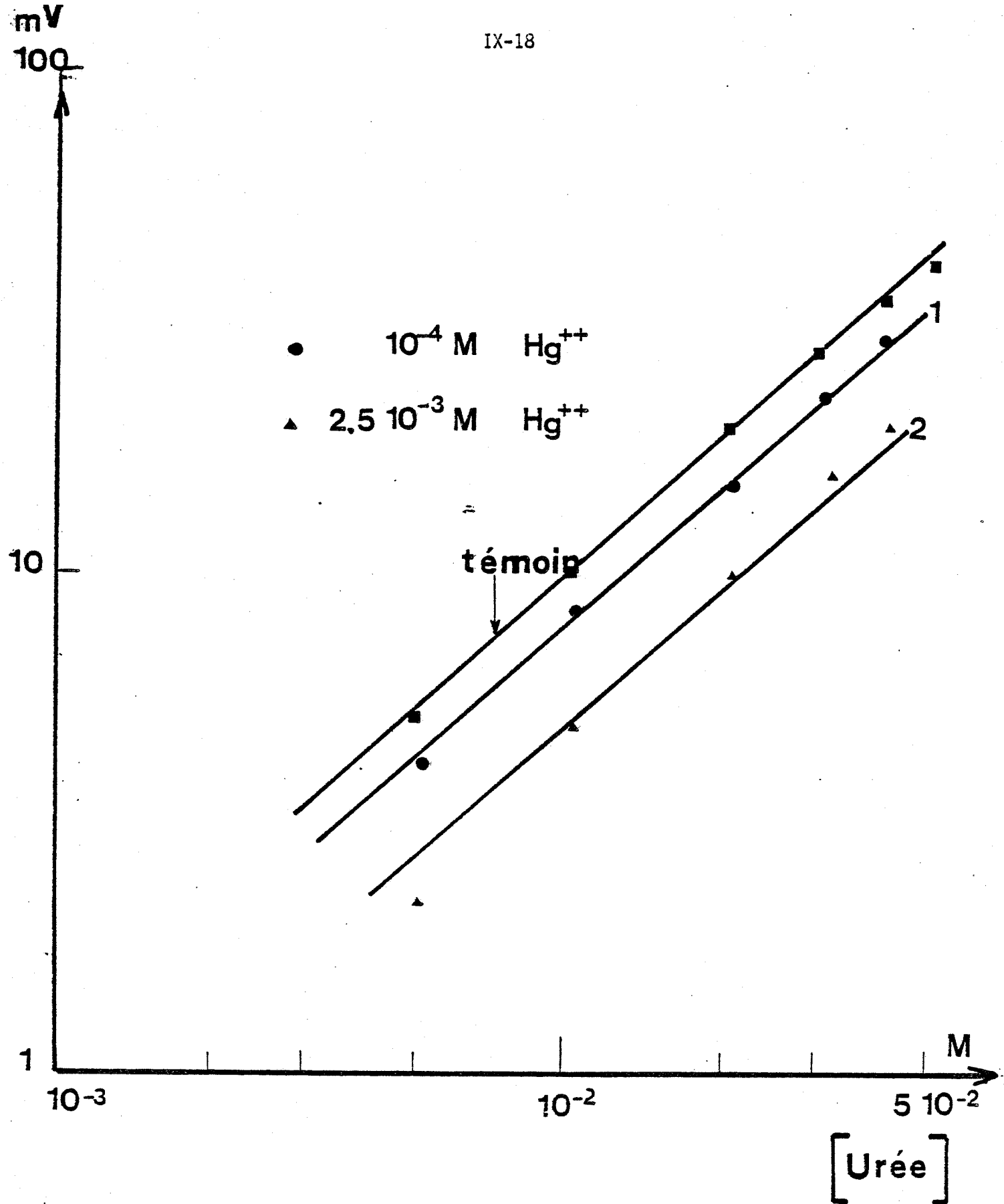


FIGURE 9 - Influence de la concentration en ions Hg^{++}
 sur la réponse du capteur enthalpimétrique à uréase immobilisée
 temps incubation = 10 minutes

- par contre pour les ions Ag^+ et Hg^{++} , inhibiteurs non réversibles immédiatement, la thermistance était mise en contact avec une solution contenant l'inhibiteur pendant un temps d'incubation T.

Après essai, la membrane était régénérée au moyen de régénérateurs, en particulier KI pour les ions Ag^+ et KCN pour les ions Hg^{++} .

Les figures 7-8 et 9 mettent en évidence les résultats expérimentaux obtenus à titre d'exemple. Dans tous les cas, dans un diagramme bi-logarithmique, les parties linéaires des courbes de dosage des inhibiteurs sont parallèles à la partie linéaire de la courbe de référence. Nous ne retrouvons pas les résultats théoriques obtenus chapitre VII, paragraphe II-2.

Nous pouvons attribuer cela à plusieurs causes :

- le pH à l'intérieur de la membrane enzymatique ne peut plus être considéré comme tout à fait constant, compte tenu de la réactivité élevée de la membrane, nécessaire afin d'avoir une réponse détectable et significative
- nous n'avons tenu compte d'aucune enthalpie libre de complexation ou d'inhibition.

Conclusion : Si les capteurs enthalpimétriques ne sont pas tout à fait adaptés pour déterminer le type d'inhibition qu'exerce un composé sur une réaction enzymatique, ils peuvent néanmoins être utilisés pour la détection des inhibiteurs, compte tenu de la quasi-linéarité des courbes de réponse.

Le principe de la détection enthalpimétrique est universel étant donné qu'il existe théoriquement toujours une enthalpie de réaction. En pratique, le couplage capteur enthalpimétrique-enzyme demande une chaleur de réaction suffisamment élevée pour une bonne détection.

La faible taille des thermistances favorise la miniaturisation de ces capteurs, pour des applications in-vivo par exemple. Il reste cependant beaucoup à faire, pour les rendre opérationnels en pratique (diminution du bruit de fond, meilleure isolation thermique du capteur...).

CHAPITRE X

CONCLUSION

CHAPITRE X

CONCLUSION

Ainsi les objectifs que nous nous étions assignés concernant l'étude du comportement des enzymes immobilisées, au moyen de capteurs, n'ont pu être atteints que grâce à la réalisation d'électrodes enzymatiques fiables, ayant des réponses reproductibles dans le temps. Ces capteurs ont permis de vérifier les résultats de l'étude fondamentale qui débouche ainsi sur la compréhension détaillée des phénomènes essentiels se déroulant au sein de la membrane enzymatique.

La méthode mathématique que nous avons adoptée a permis de résoudre un certain nombre de problèmes, en particulier la détermination des paramètres d'une matrice enzymatique, conditionnant le transfert de masse dans les réacteurs biologiques, et la mise en évidence de la "frontière libre" délimitant une zone "gelée". Ainsi nous avons pu expliquer des phénomènes couramment observés en pratique : comportement de l'enzyme immobilisée vis-à-vis du pH, de la température, de la dénaturation et face au vieillissement. Ces connaissances devraient permettre de prévoir l'action des agents dénaturants pouvant affecter le fonctionnement des réacteurs biologiques et d'en améliorer les performances.

Nous avons ensuite abordé l'étude du comportement des enzymes en présence des inhibiteurs, étant donné qu'ils sont les principaux effecteurs de la réaction enzymatique. Les essais cinétiques réalisés avec des enzymes en solution ne correspondaient pas à une approche exacte, compte tenu du temps souvent long, nécessaire pour séparer l'enzyme de ses inhibiteurs par dialyse, perméation sur gel.... Les électrodes munies de membranes contenant des enzymes immobilisées, constituent le moyen idéal pour pallier à cet inconvénient, car nous pouvons à tout instant, mettre l'enzyme en présence ou non de l'inhibiteur.

Cette étude a débouché sur la mise en évidence directe du phénomène de réversibilité de l'action d'un inhibiteur. Face aux inhibiteurs non réversibles immédiatement, nos recherches ont conduit à l'utilisation de substances autorisant la régénération rapide et efficace de l'enzyme inhibée.

L'étude mathématique appliquée aux inhibiteurs, a permis de différencier les grands types d'inhibition, les méthodes classiques de transformation linéaires telles que celles de LINEWEAVER-BURK n'ayant plus de raison d'être en phase hétérogène, car les hypothèses de base ne sont plus vérifiées, les enzymes ne fonctionnant pas dans les mêmes conditions (concentrations en substrat, pH...) en tout point de la membrane.

Le couplage de cette étude fondamentale avec les possibilités de régénération a abouti à la mise au point d'électrodes pour le dosage d'inhibiteurs. Cette méthode de dosage constitue une reproduction du phénomène naturel d'inhibition de notre organisme par des composés polluants.

D'autre part, nous avons mis en évidence la possibilité de masquer les effets des inhibiteurs par un choix de conditions telles que l'activité apparente de la membrane enzymatique soit conservée. Le dosage de l'urée sanguine, en présence d'ions fluorures, en est l'exemple le plus marquant.

Les capteurs enthalpimétriques nous semblaient être la solution quasi universelle au dosage des composés biologiques, toute réaction s'accompagnant en général d'une variation de l'enthalpie libre.

Cependant avec le bruit de fond actuel observé au niveau de tels capteurs, seules quelques substances peuvent donner lieu à un dosage significatif.

Nous avons volontairement limité notre étude à un certain nombre de paramètres qui nous ont permis d'obtenir une concordance suffisante entre les prévisions mathématiques et les résultats expérimentaux. D'autres paramètres, affectant l'activité enzymatique, pourraient être mis en évidence dans d'autres conditions expérimentales et font l'objet d'études au sein de notre laboratoire [D. VALLIN].

Les progrès réalisés, de nos jours, tant au niveau industriel, qu'agri-

cole, s'accompagnent souvent d'une perte de la qualité de notre environnement. On connaît la pollution des eaux par les rejets industriels et les pesticides, et les conséquences parfois dramatiques aussi bien sur la faune, la flore et... l'être humain. Aussi l'Homme a-t-il besoin de maîtriser son avenir par une meilleure connaissance des nuisances possibles pouvant provenir d'une amélioration forcenée de sa condition de vie. Aussi, je pense que les électrodes à enzymes immobilisées mises au point, tant pour le dosage des substrats que des inhibiteurs, participent à la réalisation de cet objectif. *La qualité de la vie ne doit pas être un vain mot dans les années à venir.*

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A.

J.F. AMBROSE, G.B. KISTIAKOWSKI,
A.G. KRIDL

J.F. AMBROSE, G.B. KISTIAKOWSKI,
G.K. ANDREW

T. ANFÄLT, A. CRANELI, D. JAGNER

T.E. ARCHER, G. ZWEIG

T.E. ARCHER, W.L. WINTERLIN,
G. ZWEIG, H.F. BERKMANN

K.B. AUGUSTINSSON

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 31

J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1232

Anal. Letters, 1973, 6 (11), 969-975

J. Agr. Food Chem., 1959, 7, 178

J. Agric. Food. Chem., 1963, 11, 471

Methods of Biochemical Analysis, Vol. V,
Interscience, New York, London

B.

J. BAGGER, J. FUSIK, J. PATOCKA,
V. HARDINA

J.N. BALDRIDGE, D.N. JESPERSEN

J. BANCROFT

T.S. BARMAN

G. BAUM

J.E. BEAM, D.J. HANKINSON

J. BEAUX

J. BEAUX, C. TRAN MINH

J. BEAUX, C. TRAN MINH

J. BEAUX, C. TRAN MINH

J. BEAUX, C. TRAN MINH

Acta Biol. Med. Germ., 1977, 36, 231

Analytical Letters, 1975, 8 (9), 683

J. Physiol., 1908, 37, 13

Enzyme Handbook, 1969, Vol 1

Anal. Biochem., 1971, 39, 65

J. Dairy Science, XLVII, 1964, 1297

D.E.A., Chimie Minérale, Grenoble, 1974

C.R. Acad. Sc. Paris, 1978, 287,
Serie C 191

Anal. Chem., 1979, 51 (1), 91-95

Contrôle de l'activité des enzymes im-
mobilisées, GECAT 79, Chalmazel,
24-25-26 Avril 1979

2e Congrès International sur les tech-
niques analytiques dans la chimie de
l'environnement, Barcelone 23-25
Novembre 1981

- J. BEAUX, R. GUYONNET, C. TRAN MINH 12th Annual Symposium on the Analytical Chemistry of Pollutants, April 14-16 1982 - Amsterdam
- K. BERTEMANN, P. ELZE, F. SELLER, D. PFEIFFER, M. JANCHEN Anal. Letters, 1982, 15 (B4), 397-404
- V. BILHOU-BOUGNOL Thèse de Docteur Ingénieur, N° 6CI, 1976
- W.J. BLAEDEL, C. OLSON Anal. Chem., 1964, 36, 843
- A.C. BOYER, L.J. BROWN, M.B. SLAMKA, C.H. HINE Toxicol. and Applied Pharmacol., 1977, 41, 389-394
- C.M. BRAUNER Thèse, N° 1480, Université Paris XI, 1975
- C.M. BRAUNER, B. NICOLENKO Lecture Notes in Maths, 1980, 782, 61-100
- G. BROUN, AIRAMEAS, E. SELIGNY, D. THOMAS Biochem. Biophys. Acta, 1969, 185, 260
- G. BROUN, E. SELIGNY, C. TRAN MINH, D. THOMAS FEBS Letters, 1970, 7, 3, 223

-C-

- P.W. CARR Anal. Chem., 1977, 49, 799
- P.W. CARR, L.D. BOWERS "Immobilized enzymes in Analytical and Clinical Chemistry", Chemical Analysis, Vol. 56, Wiley-interscience publication, 1980, 197-310
- J. CARTAUD, F. RIEGER, S. BON, J. MASSOULIE Brain Research, 1975, 88, 127-130
- J.E. CASIDA J. Agr. Chem., 1956, 4, 772-785
- T.M. CHANG Insolubilized enzymes, Raven Press, New York, 1974
- I. CHIBATA, T. TOSA, T. SATO, T. MARI, Y. MATSUO Fermentation Technology Today, G. Terui Edt., Japon, 1972, 383
- A.F. CHILDS, D.R. DAIES, A.L. GREEN, J.P. RUTTAND Brit. J. Pharmacol., 1955, 10, 462
- G. CIMASONI Biochem. J., 1966, 99, 133
- G. CIMASONI Revue Mens. Suisse d'Odonto Stomatol., 1969, 79, 2
- S.J. CLARK Gas Chromatographic Analysis of Pesticide Residues using the electron affinity detector, Jarrel, Ash Company, Newtonville, Massachusetts, 1961
- F. CONRAD "Modélisation d'un phénomène de diffusion réaction", Rapport interne, 1977, 1978, 1982

C.L. COONEY, J.C. WEAVER,
S.R. TANNENBAUM, D.V. FALLER,
A. SHIELDS, M. JAHNKE

D.M. COULSON, L.A. CAVANGAH,
J.E. DEVIES, B. WALTHER

"Enzyme engineering Vol 2", Plenum
press, New York, 1974, 411

J. Agr. Food Chem., 1960, 8, 388

.D.

W.N. DAHL, A.M.R. HOLM, K.H. SHROODER Anal. Chem. Acta., 1977, 93, 91
B. DANIELSSON, K. GADD, Anal. Letters, 1976, 9 (11), 987-1001
B. MATTIASSON, K. MOSBACH

H. DURLIAT, M. COMTAT, J. MAHENC Anal. Chem. Acta, 1979, 131-135
H. DURLIAT, M. COMTAT Anal. Chem., 1980, 52, 2109-2112

.E.

J.M. ENGASSER, C. HORVATH Biochem., 1974, 13 (19), 3845-54

.F.

S.P. FULTON, C.L. COONEY Anal. Chem., 1980, 52, 505-508

.G.

G.R. GALE, L.M. ATKINS Arch. Int. Pharmasodyn., 1969, 180 (2)
J.C. GAGE And. Pest. Control. Res., 1961, 4, 183
P.A. GIANG, S.A. HALL Analytical Chem., 1951, 23, 1830
P.A. GIANG, S.A. HALL Anal. Chem., 1964, 23, 1830-1834
A. GOLDSTEIN, M.E. DOHERTY Arch. Biochem. Biophys., 1951, 33, 35
S. GONDO, T. SATO, K. KUSUNOKI Chem. Eng. Sci., 1973, 28 (9), 1773-4
R.F. GOULD Pesticides Identification at the residue
level, Advances in Chem. Series, ACS
WASHINGTON, D.C., 1971

- P.A. GRANG, M.J. SCHECHTER
A.L. GREEN

G. GREGORIADIS, R.A. BUCKLAND
G.G. GUILBAULT, D.N. KRAMER,
P.L. CAMMON
G.G. GUILBAULT, D.N. KRAMER
G.G. GUILBAULT, J.G. MONTALVO,
R. SMITH
G.G. GUILBAULT, M.H. SADAR,
S.S. KUAN, D. CASEY
G.G. GUILBAULT, F.R. SHU
G.G. GUILBAULT

R. GUYONNET
R. GUYONNET, C. TRAN MINH,
F. LANCELOT

R. GUYONNET

R. GUYONNET, C. TRAN MINH,
J. BEAUX
R. GUYONNET, C. TRAN MINH

R. GUYONNET, J. BEAUX, C. TRAN MINH
J. Agric. Food chem., 1966, 14, 380
Biochemical Pharmacology, 1958, 1,
115-128
Nature, 1973, 244, 170
Anal. Chem., 1962, 34, 842
Anal. Chem., 1965, 37, 1675
Anal. Chem., 1965, 41, 600

Analytica Chemica Acta, 1970, 52, 75-82

Anal. Chem., 1972, 44, 13
Handbook of Enzymatic Methods of Ana-
lysis, M. DEKKER, INC, New York, 1975
DEA, Physique Nucléaire, Lyon, 1976
"Capteurs à enzymes immobilisées pour
le dosage d'inhibiteurs", Compte rendu
DGRST - N°76-7-1521, Decembre 1977
Thèse 1978, N°805, Université Claude
Bernard-Lyon I, 32
C.R. Acad. Sciences, 286, Serie C,
1978, 115
Colloque "Journées d'étude sur les élec-
trodes spécifiques à enzymes", Toulouse,
12-13 Juin 1978, communication
2e Congrès Mondial de génie chimique,
4-9 Octobre 1981, Montreal

.H.

- B.K. HAMILTON, C.R. GARDNER,
C.K. COLTON
D.F. HEATH
V. HENRI
R.B. HUGHES, S.A. KATZ, S.E. STUBLENS
AIChE Journal, 1974, 20 (3), 503-510
"Organophosphores Poison", Pergamon,
Oxford, 1961
C. R. Acad. Science, 1906, 142, 97-100
Enzymologie, 1969, 36, 332

-I-

S. ILIAS, S.A. BEG, M.M. HASSAN

J. Environ. Sci. Heath, Part 4, 1981,
A 16 (5), 523-547

H. IMAI, Y. KAWAUCHI

Bunseki Kagaku, 1981, 30 (2), 94-99

I.U.B.

Enzyme Nomenclature, Elseviser,
Amsterdam, 1972

-J-

B.J. JANDORF, E.A. CROWELL,
A.P. LEVIN

Federation Proceeding, 1955, 14, 231

-K-

E. KATCHALSKI

Symp. Funct. Biol. Syst. Macromol.
Level. Proc., Nobel Symp. Publi, 1969,
283-304

E. KATCHALSKI

Chem. Eng. Newo, 1971, 2, 86-87

S.A. KATZ

Anal. Chem., 1964, 36, 2500

S.A. KATZ, J. COWANS

Biochim. Biophys. Acta, 1968, 107, 605

G. KAY

Process. Biochem., 1968, 3, 11, 36-39

E.S. KEMPNER, J.H. MILLER

Exp. Cell. Res., 1968, 50, 150

J.P. KERNEVEZ

Thèse N°A.O.7246, Université de Paris VI,
1972

R.M. KRUPKA

Mol. Pharmacol., 1966, 2, 558-569

C.M. KUNIN

Antimicrobial Agents and Chemotherapy,
1976, 10, 3, 503

-L-

K.J. LAIDLER, P.S. BUNTING

Clarendon Press, Oxford, 1973, 76

M.C. LAREN-PACKER

Adv. Enzymol., 1970, 33, 245-308

G.K. LEE, R.A. LESCH, P.J. REILLY

Biotechnol. Bioeng., 1981, XXIII,
487-497

LINEWEAVER-BURK

J. Amer. Chem. Soc., 1934, 56, 658

J.E. LOVELOCK, S.R. LIPSKY

Anal. Chem., 1960, 33, 162

J.E. LOVELOCK, S.R. LIPSKY

J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 431

-M-

- A.D. MAC-LAREN "Soil as a system of bound enzymes",
Chem. Ind., 1974, 7, 314
- G. MANEKE In enzyme Engineering, Wiley Interscience, 185-187
- L. MARTIN Bull. John Hoph. Hosp, 1933, 52, 166
- J. MASSOULIE, S. BON, F. RIEGER, Croatica Chem. Acta., 1975, 47, 163-179
M. VIGNY
- B. MATTIASSON, B. DANIELSSON, Anal. Letters, 1976, 9 (3), 217-234
K. MOSBACH
- B. MATTIASSON, B. DANIELSSON, Anal. Letters, 1976, 9 (10), 867-889
K. MOSBACH
- B. MATTIASSON, B. DANIELSSON, FEBS Letters, 1978, 85, 2203
C. HERMANSSON, K. MOSBACH
- C.E. MENDOZA Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1974,
3, 1971
- L. MICHAELIS, M. MENTEN Biochem. Z., 1913, 49, 333
- H.O. MICHEL, E.C. GORDON, Environm. Sc. and Technol., 1973,
J. EPSTEIN 7, 11
- R. MISKUS, M.E. TZANAKAKIS, J. Econ. Entomol., 1959, 52, 76
S.M. SMITH
- G.J. MOODY, J.R. THOMAS Analyst, 1975, 100, 609
MOSBACH Immobilized Enzymes. Methods in enzymology, 1976, Acad. Press New York, Vol. 44
- J. MUELLER, T. ZWING Biochim. Biophys. Acta., 1982, 705 (1),
117-123

-O-

- R.D. O'BRIEN "Toxic phosphores Esters", Academic,
New York, 1960
- L. OGREEN, G. JOHANSSON Anal. Chem. Acta., 1978, 91, 1-11
- H.D. ORTH, W. BRUMMER Augerw. Chem. Inst. Ed. England, 1972,
11, 249

.P.

- V.S. PATWARDHAN, N.G. KARANTH Biotechnol. Bioeng., 1982, 24 (4), 763-80
- L.T. POHER J. Pharm. Exp. Ther., 1967, 156, 500
- E.J. POZIOMEK, B.E. HACKLEY, J. Org. Chem., 1958, 23, 714-717
- J.G. STEINBERG
- W.C. PURDY Electroanalytical Methods in Biochemistry, Mc Grann Hill, New York, 1965

.R.

- D.L. REED, K. GOTO, C.H. WANG Anal. Biochem., 1966, 16, 59
- S. RICH, R. IANNIELLO, N.D. JESPERSEN Anal. Chem., 1979, 51, 204-206
- J.L. ROMETTE, B. FROMENT, D. THOMAS Clin. Chim. Acta., 1979, 95, 249

.S.

- M.H. SADAR, S.S. KUAN, Analytical Chemistry, 1970, 42, 1770-1774
- G.G. GUILBAULT
- A.W. SEITZ, M.H. CHESTER Anal. Lett., 1977, 10 (1), 11-19
- E. SELEGNY "Some systems coupling enzymic reactions and others phenomena". Polyelectrolytes Reidel Publ. Co Dordrecht Hull, 1974
- D.A. SELF, G. KAY, M.D. LILLY Biotech. and Bioeng., 1969, 11, 337
- W.H.R. SHAW J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 2160
- W.H.R. SHAW, D.N. RAVAL J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 3184
- T. SHINBO, M. SUGIURA Anal. Chem., 1979, 51 (1), 100-104
- R.L. SHUTZMANN, W.F. BARTHEL J. Assoc. Offic. Anal. Chemist., 1969, 52, 151
- I.H. SILMAN, E. KATCHALSKI Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 837-908
- G.R. STARK Biochemical Aspects of reactions on solid supports, Academic Press, 1971
- G.F. SUDINA, G.M. KOBELTOV, Vestor. Mosk. Univ. Ser. 2. Khim, 1982
- S.D. KARFOLOMEAV 23 (3), 195-206
- J.B. SUMMER, Z. MYRBACH Z. Physiol. Chem., 1930, 189, 218
- J.B. SUMMER The Enzymes, 1951, 1, 886

.T.

- | | |
|---|--|
| D.R. THEVENOT, R. STERNBERG,
P.C. COULET, J. LAURENT, D.C. GAUTHERON | Anal. Chem., 1979, <u>51</u> , 96-100 |
| E.C. TOREN, F.J. BURGER | Mickrochim. Acta., 1968, 1049 |
| C. TRAN MINH | Thèse, Rouen, 1971, N°6262 |
| C. TRAN MINH, V. BOUGNOL-BILHOU,
F. LANCELOT | DECHEMA 6th European Symposium-Heidel-
berg -6-8/4/1976, III, 125-134 |
| C. TRAN MINH, J. BEAUX | Journées d'étude sur les Electrodes spé-
cifiques à enzymes, Toulouse, 12-13
Juin 1978 |

.V.

- | | |
|-------------------------|--|
| D. VALLIN, C. TRAN MINH | Analytical Chemistry, 1978, <u>50</u> , (13),
1874 |
| D. VALLIN, C. TRAN MINH | Biochem. Biophys. Acta., 1979, <u>571</u> ,
321-332 |

.W.

- | | |
|----------------------|--|
| O. WARBURG | Biochem. Z., 1924, <u>152</u> , 51 |
| I.B. WILSON | J. Biol. Chem., 1952, <u>190</u> , 113 |
| I.B. WILSON, C. QUAN | HBB, 1958, <u>73</u> , 131 |

AUTORISATION DE SOUTENANCE

VU les dispositions de l'article 3 de l'arrêté du 16 avril 1974,

VU les rapports de présentation de Messieurs

- . C. TRAN-MINH, Maître de recherche
- . J.D.R THOMAS, Professeur
- . M. COMTAT, Professeur

Monsieur BEAUX Jacques

est autorisé à présenter une thèse en soutenance pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES.

Fait à Grenoble, le 03 octobre 1983

Le Président de l'USMG

11 OCT. 1983

Le Président

M. TANCHE



Le Président de l'I.N.P.-G

D. BLOCH

Président

de l'Institut National Polytechnique
de Grenoble

P.O. le Vice-Président,

